

Einfluss der NADPH-Oxidasen auf die Proliferation, die Differenzierung und
die Migration von Zellen

– Untersucht am murinen *In-Vitro*-Modell *Embryoid Body* –



seit 1558

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Biochem. **Carola Ruhe**

geboren am 26. November 1976 in Bad Langensalza

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Jörg Müller (FSU Jena)
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Maria Wartenberg (FSU Jena)
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Agnes Görlach (Technische Universität München)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 25. Januar 2010

H.K.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	IX
Summary	X
Danksagung.....	XI
1 Einleitung	1
1.1 Der Multienzymkomplex NADPH-Oxidase	2
1.1.1 Die Entdeckung der NADPH-Oxidasen.....	2
1.1.2 Die Familie der NADPH-Oxidasen.....	3
1.1.2.1 Aufbau und Funktion	3
1.1.2.2 Die Isoformen der NADPH-Oxidasen.....	4
1.1.3 Physiologische Funktionen der NADPH-Oxidasen	6
1.1.4 Pharmakologie der NADPH-Oxidasen	8
1.2 Der <i>Embryoid Body</i> als Modellsystem für Differenzierungsprozesse	11
1.2.1 Murine embryonale Stammzellen	11
1.2.2 Pluripotente Stammzellen	11
1.2.3 Der <i>Embryoid Body</i>	12
1.3 Zielstellung der Arbeit	13
2 Material	15
2.1 Zelllinien.....	15
2.2 Bakterien	15
2.3 Laborgeräte.....	15
2.4 Verbrauchsmaterialien	15
2.5 Medien/Medienzusätze.....	16
2.6 Chemikalien/Reagenzien/Kits	16
2.7 Antikörper.....	17
2.8 Oligonukleotide.....	18
2.9 Plasmide	18
2.10 MISSION [®] -shRNA (Sigma-Adlrich, München)	19
2.11 Software.....	19
3 Methoden	20

3.1 Zellkulturmethoden	20
3.1.1 Die Stammzelllinie CGR8	20
3.1.1.1 Kultivierung der undifferenzierten CGR8-ES-Zellen	20
3.1.1.2 Die Spinnerkultur – Differenzierung in <i>Embryoid Bodies</i> (EBs)	20
3.1.2 Die Tumorzelllinie 4T1	21
3.1.2.1 Kultivierung der Zelllinie 4T1	21
3.1.2.2 Kultivierung der 4T1-Zellen als 3D-Kultur	21
3.1.3 Die Konfrontationskultur	22
3.1.4 Die Helferzelllinie HEK293T	22
3.1.4.1 Kultivierung der Zelllinie HEK293T	22
3.1.5 Behandlung der CGR8-EBs mit pharmakologischen Substanzen	23
3.2 Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	23
3.2.1 Detektion der ROS mit Dichlorofluorescein (DCF)	23
3.2.2 Detektion der ROS mit Dihydroethidium (DHE)	24
3.3 Immunofluoreszenzfärbung	24
3.3.1 Fixierung und Antikörperfärbung	24
3.4 Molekularbiologische Methoden	25
3.4.1 RNA-Isolierung	25
3.4.2 Quantifizierung der Ribonukleinsäuren	25
3.4.3 RNA-Gelelektrophorese	26
3.4.4 cDNA-Synthese	26
3.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
3.4.5.1 Konventionelle PCR	27
3.4.5.2 Real-time PCR	28
3.4.6 shRNA-Technik	29
3.4.6.1 Kultivierung der transformierten <i>E. coli</i> -Stämme und Plasmidisolierung	29
3.4.6.2 Produktion der lentiviralen Partikel	30
3.4.6.3 Ernte der virushaltigen Überstände	30
3.4.6.4 Transduktion der embryonalen Stammzelllinie CGR8 und Selektion	30
3.5 Proteinanalytik mittels Western Blot-Analyse	31
3.5.1 Proteinisolierung	31
3.5.2 Proteinbestimmung nach BRADFORD	31
3.5.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese – SDS-PAGE	32
3.5.3.1 Herstellung von Trenn- und Sammelgelen	32
3.5.3.2 SDS-Page	32
3.5.4 Elektrotansfer und Immunodetektion	33
3.5.5 Strippen der Membran	34
3.6 Statistische Auswertung	34

4	Ergebnisse	35
4.1	Expression der NOX-Untereinheiten in <i>CGR8-Embryoid Bodies</i>	35
4.1.1	Die katalytischen Untereinheiten NOX1, NOX2 und NOX4	35
4.1.2	Die regulatorischen Untereinheiten	38
4.2	Migrationsstudie an Konfrontationskulturen	39
4.3	ROS-Generierung in <i>CGR8-EBs</i> während der Differenzierung	40
4.4	Einfluss von LIF und inaktiven Fibroblasten auf die ROS-Generierung	41
4.5	Etablierung stabiler shRNA- <i>CGR8</i> -Zelllinien	43
4.5.1	Nachweis der Funktionalität der lentiviralen Transduktion	43
4.5.2	Nachweis der Unterdrückung der NOX1, NOX2 und NOX4 durch shRNA	44
4.5.3	Kreuzreaktion der spezifischen shRNAs mit den anderen NOX-Isoformen	47
4.6	NADPH-Oxidasen in der Differenzierung <i>CGR8-ES-Zellen</i>	49
4.6.1	Pharmakologische Untersuchungen	49
4.6.1.1	Messung der ROS mittels DCF	49
4.6.1.2	Messung der ROS mittels DHE	51
4.6.1.3	NADPH-Oxidasen und Angiogenese	52
4.6.1.4	NADPH-Oxidasen und die kardiale Differenzierung	58
4.6.2	shRNA-Studien	61
4.6.2.1	Messung der ROS mittels DCF	61
4.6.2.2	Messung der ROS mittels DHE	62
4.6.2.3	Einfluss der NOX1-, NOX2- und NOX4-Unterdrückung auf die Angiogenese	63
4.6.2.4	Einfluss der NOX1-, NOX2- und NOX4-Unterdrückung auf die Kardiomyogenese ..	70
5	Diskussion	75
5.1	Auftreten der NADPH-Oxidasen während der Differenzierung	75
5.2	Redoxstatus in den <i>CGR8-EBs</i> während der Differenzierung	77
5.3	NADPH-Oxidasen und ihre Rolle in der kardialen Differenzierung	78
5.4	NADPH-Oxidasen und ihre Rolle in der Angiogenese	84
5.5	Pharmakologische versus shRNA-vermittelte NADPH-Oxidase-Hemmung	86
5.6	Ausblick	87
6	Literaturverzeichnis	89
	Anhang	i
	Publikationen und Posterbeiträge	iv
	Ehrenwörtliche Erklärung	v
	Lebenslauf	vi

Abkürzungsverzeichnis

μM	Mikromolar
A	Absorption
add	addieren
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
ApoE	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Konzentration
cDNA	komplementäre DNA, <i>complementary DNA</i>
CGD	<i>Chronic Granulomatous Disease</i>
cLSM	konfokales Laserscanningmikroskop, <i>confocal laser scanning microscope</i>
CMFDA	5-Chloromethylfluoresceindiazetat
d	Tag
DCF	Dichlorofluorescein
DHE	Dihydroethidium
DIA	<i>Differentiation Inhibiting Activity</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPI	Diphenyliodonium
ds	<i>docking sequence</i>
DTT	Dithiothreitol
DUOX	Duale Oxidasen
EB	<i>Embryoid Body</i>
ECC	<i>Embryonic Carcinoma Cells</i>
ECL	<i>Enhanced Chemilumineszenz</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGC	<i>Embryonic Germ Cells</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
ESC	<i>Embryonic Stem Cells</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
g	Erdschwerebeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GMEM	<i>Glasgow Minimum Essential Medium</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H₂DCF-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
I	Stromstärke
ICM	<i>Inner Cell Mass</i>
IF	Immunofluoreszenz
KoKu	Konfrontationskultur
LAS	<i>Luminescent Image Analysis System</i>

LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
MHC	<i>Myosin Heavy Chain</i>
min	Minute
MW	Mittelwert
MLC	<i>Myosin Light Chain</i>
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nm	Nanometer
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NOX	NADPH-Oxidase
NOXA1	NOX-Aktivator1
NOXO1	NOX-Organisator1
O₂	molekularer Sauerstoff (Singulett-sauerstoff)
O₂^{•-}	Superoxidanionradikal
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor 1</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PECAM-1	<i>Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>
PEI	Polyethylenimin
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR, <i>reverse transcription-PCR</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SOD	Superoxiddismutase
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interference RNA</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
t	Zeit
T_a	Annelingtemperatur
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TET	Tetracyclin
TGF-β1	<i>Tumor Growth Factor-β1</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
U	Spannung
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volumen
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WB	Western Blot

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Die Isoformen der NADPH-Familie, deren Regulatorproteine und ihre Expressionsverteilung.	3
Tab. 2: Die verwendeten pharmakologischen Substanzen	23
Tab. 3: Fluoreszenzfarbstoffe und -proteine.....	25
Tab. 4: Reaktionsansätze und –bedingungen zur Herstellung von cDNA.....	26
Tab. 5: Reaktionsbedingungen zur endgültigen Herstellung von cDNA.....	27
Tab. 6: PCR-Reaktionsansatz	27
Tab. 7: PCR-Reaktionsbedingungen	28
Tab. 8: Real-Time PCR-Reaktionsansatz	28
Tab. 9: Real-Time PCR-Bedingungen.....	29
Tab. 10: Komponenten und deren benötigte Menge für ein Trenngel (10 bzw. 12 %)	32
Tab. 11: Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die Generierung der ROS.....	50

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung und Aktivierung der phagozytären NADPH-Oxidase [modifiziert nach Lambeth, 2004].	4
Abb. 2: Transmembrane Topologie und Struktur der NOX-Familienmitglieder.	5
Abb. 3: Herkunft und Gewinnung pluripotenter embryonaler Stammzellen der Maus.	12
Abb. 4: Charakterisierung der katalytischen Untereinheiten NOX1, NOX2 und NOX4 in CGR8-EBs während eines Differenzierungszeitraumes von 14 Tagen.	35
Abb. 5: Charakterisierung der katalytischen Untereinheiten NOX1, NOX2 und NOX4 mittels cLSM.	36
Abb. 6: Charakterisierung des Proteinlevels der katalytischen Untereinheiten NOX1 und NOX4.	37
Abb. 7: Charakterisierung der regulatorischen Untereinheiten der NADPH-Oxidasen.	38
Abb. 8: Untersuchung des Migrationsverhaltens von 4T1 Sphäroiden (grün) in CGR8-EBs nach Behandlung mit den NADPH-Oxidaseinhibitoren DPI (10 µM) und Apocynin (100 µM).	40
Abb. 9: Messung der intrazellulären ROS-Bildung in CGR8-EBs während eines Differenzierungszeitraumes von 12 Tagen.	41
Abb. 10: Einfluss von LIF und Fibroblasten auf die ROS-Generierung.	42
Abb. 11: Nachweis der methodischen Funktionalität der lentiviralen Transduktion von CGR8-Zellen durch Einbringen eines GFP-kodierenden Vektors.	44
Abb. 12: Suppression der katalytischen Untereinheit NOX1 mittels shRNA.	45
Abb. 13: Suppression der katalytischen Untereinheit NOX2 mittels shRNA.	46
Abb. 14: Suppression der katalytischen Untereinheit NOX4 mittels shRNA.	47
Abb. 15: Kreuzreaktionen der shRNA-NOX1.	48
Abb. 16: Kreuzreaktionen der shRNA-NOX4.	48
Abb. 17: Kreuzreaktionen der shRNA-NOX2.	49
Abb. 18: Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die intrazelluläre ROS-Generierung.	50
Abb. 19: Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die Superoxidaniongenerierung.	51
Abb. 20: Charakterisierung der Gefäßentwicklung in CGR8-EBs.	53
Abb. 21: Charakterisierung der Matrixmetalloproteinasen MMP9 und MMP2 in CGR8-EBs während eines Differenzierungszeitraumes von 14 Tagen.	53
Abb. 22: Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die Expression des Endothelmarkers <i>PECAM-1</i>	55
Abb. 23: Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die Synthese von <i>PECAM-1</i>	56
Abb. 24: Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die Expression des Endothelmarkers <i>VE-Cadherin</i>	57
Abb. 25: Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die Expression von <i>MMP9</i>	58

Abb. 26: Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die Ausbildung kontrahierender Areale.	59
Abb. 27: Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die Expression des kardialen Markers <i>MLC2v</i>	60
Abb. 28: Einfluss der NADPH-Oxidasen auf die Synthese von beta-MHC.	61
Abb. 29: Einfluss der shRNAs NOX1, NOX2 und NOX4 auf die intrazelluläre ROS-Generierung.	62
Abb. 30: Einfluss der shRNAs NOX1, NOX2 und NOX4 auf die Superoxidaniongenerierung.	63
Abb. 31: Einfluss der shRNA-NOX1 auf die Expression des Endothelmarkers <i>PECAM-1</i>	64
Abb. 32: Einfluss der shRNA-NOX2 auf die Expression des Endothelmarkers <i>PECAM-1</i>	65
Abb. 33: Einfluss der shRNA-NOX4 auf die Expression des Endothelmarkers <i>PECAM-1</i>	66
Abb. 34: Einfluss der shRNA-NOX1 auf die Synthese von PECAM-1.	67
Abb. 35: Einfluss der shRNA-NOX4 auf die Synthese von PECAM-1.	68
Abb. 36: Einfluss der shRNAs NOX1, NOX2 und NOX4 auf die Gefäßbildung.	69
Abb. 37: Einfluss der shRNAs NOX1, NOX2 und NOX4 auf die Ausbildung kontrahierender Areale.	70
Abb. 38: Einfluss der shRNA-NOX1 auf die Expression des kardialen Markers <i>beta-MHC</i>	71
Abb. 39: Einfluss der shRNA-NOX4 auf die Expression des kardialen Markers <i>beta-MHC</i>	72
Abb. 40: Einfluss der shRNA-NOX2 auf die Expression des kardialen Markers <i>beta-MHC</i>	73
Abb. 41: Einfluss der shRNA-NOX1 auf die Synthese von alpha-Actinin und beta-MHC.	74
Abb. 42: Einfluss der shRNA-NOX4 auf die Synthese von alpha-Actinin und beta-MHC.	74

Zusammenfassung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), welche aus dem Enzymkomplex NADPH-Oxidase (NOX) generiert werden, können als *second messenger* agieren und somit regulierend in zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Genexpression eingreifen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der NADPH-Oxidasen NOX1, NOX2 und NOX4 auf die kardiale und vaskuläre Differenzierung in dem murinen *In-Vitro*-Differenzierungsmodell *Embryoid Body* (EB) der embryonalen CGR8-Stammzelllinie über zwei unabhängige Experimente untersucht: (I) Hemmung der NADPH-Oxidaseaktivität durch die Inhibitoren DPI, Apocynin und AEBSF und (II) Etablierung von CGR8-Stammzelllinien, welche über shRNA die Expression von NOX1, NOX2 oder NOX4 unterdrücken. Für die Untersuchung der Differenzierung wurde der Endothelmarker PECAM-1 für die vaskuläre Entwicklung und alpha-Actinin, beta-MHC sowie die Auszählung der kontrahierenden Areale für die kardiale Differenzierung in den CGR8-EBs herangezogen. Zuvor wurde das Auftreten der verschiedenen NOX-Isoformen über 14 Tage mittels Real Time-PCR gemessen, wobei für NOX1 und NOX4 ein Maximum am sechsten Tag, aber für NOX2 ein Maximum am zehnten Tag der Differenzierung in den CGR8-EBs beobachtet wurde. Die Messung der intrazellulären ROS in den CGR8-EBs mit H₂DCF-DA ergab ebenfalls ein Maximum am sechsten Tag. Den stärksten Effekt auf die Differenzierung der CGR8-EBs zeigte DPI. So wurde die Kontraktibilität der CGR8-EBs um 20 % herabgesetzt, wohingegen Apocynin und AEBSF keinen vergleichbaren Einfluss auf die kardiale Differenzierung in den CGR8-EBs bewirkte. Ferner wurde durch die Unterdrückung der NOX4 durch shRNA geklärt, dass erstere während der kardialen Differenzierung für die Bildung des kontraktilen Apparates mit verantwortlich sind. So war die Anzahl der kontrahierenden Areale um 60 % geringer und die Expression der kardialen Marker alpha-Actinin und beta-MHC war deutlich eingeschränkt. In der vaskulären Differenzierung wurde durch die Hemmung der NOX1 und NOX4 eine Verzögerung der Ausbildung blutgefäßähnlicher Strukturen beobachtet. Diese ausgewählten Ergebnisse belegen das Erreichen des Arbeitszieles, einen Beitrag zur Aufklärung der kardialen und vaskulären Differenzierung von CG8-Stammzelllinie in Abhängigkeit von ROS zu leisten.

Summary

Reactive oxygen species (ROS) generated by the NADPH-oxidase enzyme complex may act as second messenger and can thus impair cellular processes such as proliferation, differentiation, and gene expression. Aim of this study was to assess the impact of the NADPH-oxidases NOX1, NOX2, and NOX4 on the cardiac and vascular differentiation using the murine *In-Vitro*-differentiation model *Embryoid Body* (EB) of the embryonic CGR8-stem cell line by two independent experimental setups: (I) blocking NADPH-oxidase activity by the inhibitors DPI, apocynin, and AEBSF, and (II) establishment of CGR8-stem cell lines repressing NOX1, NOX2, or NOX3 expression by shRNA technique. The endothelial marker PECAM-1 was used for the determining vascular development, and for cardiac differentiation alpha-actinin, beta-MHC, as well as the number of contracting areas were examined. Prior to this, the expression of the different NOX-isoforms were detected using Real Time-PCR, in which a maximal NOX1- and NOX2-expression was found on sixth, whereas for NOX2 on tenth day of CGR8-EBs differentiation. The assessment of intracellular ROS in CGR8-EBs by H₂DCF-DA also revealed a maximum on day six. DPI showed the strongest effect on differentiation of CGR8-EBs which resulted in a 20 % decrease of CGR8-EBs-contraction. Though, this effect on cardiac differentiation of CGR8-EBs was not seen by apocynin and AEBSF. Furthermore, by NOX4 repression using shRNA it was shown that during cardiac differentiation the former has been involved in the development of the contractile apparatus as the number of contracting areas diminished by 60 % and the expression level of the cardiac marker alpha-actinin and beta-MHC substantially decreased. An inhibition of NOX1 and NOX4 during vascular differentiation delayed the formation of capillary-like structures. These chosen results characterise the impact of ROS generated by NADPH- during cardiac and vascular differentiation of CGR8-stem cell lines.

Danksagung

Für die Ermöglichung der Qualifizierung durch die Überlassung des Themas, sowie für die Unterstützung durch konstruktive Diskussionen, die Bewilligung von Tagungsteilnahmen und zahllose Anregungen und Anleitungen, bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Maria Wartenberg.

Als eine weitere Voraussetzung für den Erfolg meiner Arbeit, sehe ich die Einweisung in die Methodik der shRNA-Technik, der freundlichen Bereitstellung von Plasmiden sowie der diesbezüglichen Diskussionen durch Herrn PD Dr. Jörg Müller.

Darüber hinaus danke ich allen, die mit mir, neben mir, um mich herum und vor mir gearbeitet haben, da insbesondere die gemeinsamen Arbeiten, Diskussionen, Kritiken und Anregungen unverzichtbar waren. Dies richtet sich besonders an meine Mitdoktoranden unserer Gruppe Caroline Bartsch (geb. Zietlow), Madleine Richter (geb. Hannig) und Anne Wolheim.

Von ganz besonderer Bedeutung war das Zusammenleben im Rahmen unserer WG während der gesamten Zeit in Jena mit meiner Freundin und Mitstreiterin Nina Habermann. Ich hoffe, dass sich unsere Freundschaft lange halten wird. UCKERMARK! Wir kommen!

Für die sozialen Unternehmungen abends in Jena, möchte ich mich bei Carla Münster und Benjamin Busch bedanken. Und! Danke für das Korrekturlesen dieser Arbeit, in einer Zeit in der ihr beide selber Stress hattet.

Es kommt ferner hinzu, dass die familiäre Unterstützung wesentlich für die Entstehung der Arbeit war. Das betrifft insbesondere meine lieben Eltern Christina und Georg sowie meinem Zwillingbruder Holger.

DANKE AN ALLE!

1 Einleitung

Bereits in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts wurde beobachtet, dass eine Zunahme von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Zellen oxidativen Stress induziert und schädigende Auswirkungen zur Folge hat. Als ROS bezeichnet man eine Familie von kleinen, aber hoch reaktiven Molekülen, die sich von molekularem Sauerstoff ableiten. Dazu gehören echte freie Radikale, wie das Superoxidanion ($O_2^{\bullet-}$), das Hydroxylradikal (HO^{\bullet}) und das Stickstoffmonoxidradikal (NO^{\bullet}). Sie zeichnen sich durch ein oder mehrere ungepaarte Elektronen aus und bilden eine eigene Gruppe der ROS. Sie sind zu unterscheiden von ROS, die keine freien Elektronen besitzen, wie das Hydrogenperoxid (H_2O_2), das Peroxynitrit ($ONOO^-$) und die hypochlorische Säure ($HOCl$). Die grundlegende Eigenschaft der freien Radikale ist, deren chemische Reaktion mit anderen Molekülen wiederum freie Radikale hervorbringt. Dieser Kreislauf kann nur beendet werden, wenn zwei Radikale aufeinander treffen. Trotz ihrer kurzen Lebensdauer haben sie eine hohe biologische Wirksamkeit [Babior, 2000]. Im Verlauf weiterer Untersuchungen der Wirkung von ROS in den Zellen, wurde erkannt, dass geringe Mengen an ROS als Signalmoleküle fungieren können. So vermitteln sie zum Beispiel die Proliferation, die Migration, die Differenzierung von Zellen und die Expression von Genen. Innerhalb der Zellen gibt es verschiedene potenzielle Quellen für die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies so zum Beispiel die mitochondriale Elektronentransportkette [Boveris and Chance, 1973, Jensen, 1966], die Xanthinoxidase [Fridovich, 1970], die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) [Heinzel et al., 1992, Mayer et al., 1991] und die NADPH-Oxidasen.

In dieser Arbeit stehen die NADPH-Oxidasen als Quelle für ROS im Mittelpunkt. Die Hauptaufgabe dieses Multienzymkomplexes ist die Generierung von Superoxidanion ($O_2^{\bullet-}$), welches die anderen genannten Enzyme lediglich als ein Nebenprodukt produzieren. Die ROS, die durch die NADPH-Oxidasen entstehen, können sowohl positiv als auch negativ auf den Organismus wirken. So gehen zum Beispiel viele pathophysiologische Effekte mit einer erhöhten Aktivität der NADPH-Oxidase und der dadurch verstärkten Produktion an ROS einher. So gezeigt an Erkrankungen des vaskulären Systems. In der nachfolgenden Arbeit jedoch steht der Einfluss der ROS, generiert aus dem Enzymkomplex NADPH-Oxidase, auf Differenzierungsprozesse in murinen Stammzellen im Vordergrund.

1.1 Der Multienzymkomplex NADPH-Oxidase

Eine der wichtigsten enzymatischen Quellen für reaktive Sauerstoffspezies ist der Multienzymkomplex Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase, kurz: NOX), der sich aus katalytischen und regulatorischen Untereinheiten zusammensetzt. Er katalysiert die Ein-Elektronen-Reduktion von molekularem Sauerstoff zur Bildung des Superoxidanions ($O_2^{\bullet-}$) unter Verwendung von NADPH als Substrat. Aus dem Superoxidanion können durch die entsprechende Reaktion alle anderen Arten von ROS hervorgehen. So katalysiert zum Beispiel das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) die Bildung von Hydrogenperoxid (H_2O_2), welches wiederum durch das Enzym Katalase zu Sauerstoff und Wasser umgesetzt wird. Eine weitere mögliche Interaktion von $O_2^{\bullet-}$ ist die Reaktion mit Stickstoffmonoxid (NO^{\bullet}) zu Peroxynitrit ($ONOO^{\bullet-}$) [Gryglewski et al., 1986].

1.1.1 Die Entdeckung der NADPH-Oxidasen

Obwohl noch nicht als NADPH-Oxidase identifiziert, wurde das Phänomen des *Respiratory Burst* in den Zellen bereits in der ersten Hälfte des zwanzigsten Jahrhunderts beschrieben. Diese frühen Beobachtungen wurden in Seeigeleiern [Warburg, 1908], in Phagozyten [Baldridge and Gerard, 1933] und in Spermatozyten [MacLeod, 1943] gemacht. Im Jahre 1959 demonstrierten Sbarra und Karnovsky, dass der phagozytotische *Respiratory Burst* ein energieverbrauchender Prozess ist, der vom Glukosemetabolismus abhängig ist [Sbarra and Karnovsky, 1959]. Kurze Zeit später zeigte dann die Arbeitsgruppe um Iyer, dass der *Respiratory Burst* durch die Generierung von Hydrogenperoxid entsteht [Iyer et al., 1961]. Dies führte zu kontroversen Diskussionen, da angenommen wurde, dass das Hauptsubstrat für das Enzym NADPH oder NADH ist. Im Jahr 1964 machten Rossi und Zatti die NADPH-Oxidase für den *Respiratory Burst* verantwortlich [Rossi and Zatti, 1964]. Ungefähr zehn Jahre später wurde schließlich durch Babior nachgewiesen, dass das Produkt der NADPH-Oxidase das Superoxidanion und nicht das Hydrogenperoxid ist [Babior et al., 1973].

Die Identifizierung und Charakterisierung des Enzymes war die nächste Herausforderung. Der Durchbruch gelang schließlich der Arbeitsgruppe um Segal und Jones. Sie fanden heraus, dass das Cytochrome b_{558} in den Leukozyten von CGD-Patienten (*Chronic Granulomatous Disease*) fehlte [Segal and Jones, 1978]. In den darauf folgenden Jahren wurde diese katalytische Untereinheit der NADPH-Oxidase allgemein als gp91^{phox} (heute auch als NOX2 bekannt) bezeichnet.

1.1.2 Die Familie der NADPH-Oxidasen

1.1.2.1 Aufbau und Funktion

Das Enzymsystem NADPH-Oxidase existiert sowohl in phagozytären als auch in nichtphagozytären Zellen [Babior, 1999, Bayraktutan et al., 1998, Griendling et al., 2000]. Bis heute sind sieben NOX-Isoformen, zwei Organisatoruntereinheiten ($p47^{\text{phox}}$, NOXO1 [NOX Organisator 1]) und zwei Aktivatoruntereinheiten ($p67^{\text{phox}}$, NOXA1 [NOX-Aktivator 1]) des NADPH-Oxidasekomplexes beschrieben (Tab. 1). Weitere Untereinheiten sind $p22^{\text{phox}}$, $p40^{\text{phox}}$ und die kleinen GTPase-Proteine Rac1 und Rac2 [Babior, 1999].

Tab. 1: Die Isoformen der NADPH-Familie, deren Regulatorproteine und ihre Expressionsverteilung.

Katalytische Untereinheiten	Regulatorische Untereinheiten	Expression
NOX1	$p22^{\text{phox}}$, NOXO1, NOXA1, Rac1	Kolon, Niere, Muskelzellen, Endothelzellen, Prostata, Placenta,
NOX2	$p22^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$, Rac1, Rac2	Phagozyten, B-Lymphozyten, Kardiomyozyten, Endothelzellen, Fibroblasten
NOX3	$p22^{\text{phox}}$, NOXO1, NOXA1, Rac1	Innenohr, fetale Niere, fetale Milz
NOX4	$p22^{\text{phox}}$	Niere, Blutgefäße, Endothelium,
NOX5		Milz, Testis, Muskelzellen
DUOX1 und 2		Schilddrüse

Alle katalytischen Untereinheiten der NADPH-Oxidasen sind Transmembranproteine, die Elektronen entlang der biologischen Membran transportieren, um Sauerstoff zu Superoxidanion zu reduzieren. Die regulatorischen Untereinheiten $p47^{\text{phox}}$ /NOXO1 und $p67^{\text{phox}}$ /NOXA1 hingegen sind im Zytosol der Zelle lokalisiert.

Zum besseren Verständnis des Aufbaus und der Aktivierung der NADPH-Oxidasen, sollen diese anhand der phagozytären NADPH-Oxidase NOX2 erläutert werden (Abb. 1). Diese Isoform besteht aus einem membranassoziierten Cytochrom b_{558} , welches sich aus den zwei Untereinheiten $p22^{\text{phox}}$ und $gp91^{\text{phox}}$ zusammensetzt, sowie den essentiellen, zytosolischen Untereinheiten $p40^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ und den GTP-bindenden Proteinen Rac1 oder Rac2 [Babior, 1999]. Die katalytische Untereinheit $gp91^{\text{phox}}$ besitzt als Koenzym zwei Hämmoleküle und eine FAD-Gruppe (Flavin-Adenin-Dinukleotid). Normalerweise ist die neutrophile NADPH-Oxidase, die zum unspezifischen Abwehrsystem des Organismus gehört, inaktiv. Die Untereinheiten $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ und $p40^{\text{phox}}$ sind im Zytosol der Zelle als Dreierkomplex lokalisiert [Vignais, 2002]. Nach entsprechender Stimulation reagiert die neutrophile NADPH-Oxidase mit der Produktion von Superoxidanionradikalen im Millimolarbereich [Griendling et al., 2000, Li et al.,

2002]. Für die Entstehung eines aktiven Enzymsystems müssen die zytosolischen mit den membranständigen Komponenten interagieren. Hierfür sind zwei entscheidende Schritte notwendig, so muss das GDP (Guanosindiphosphat) gegen GTP (Guanosintriphosphat) am Rac-Molekül ausgetauscht und die Untereinheit $p47^{\text{phox}}$ durch die Proteinkinase C phosphoryliert werden [Ago et al., 2003].

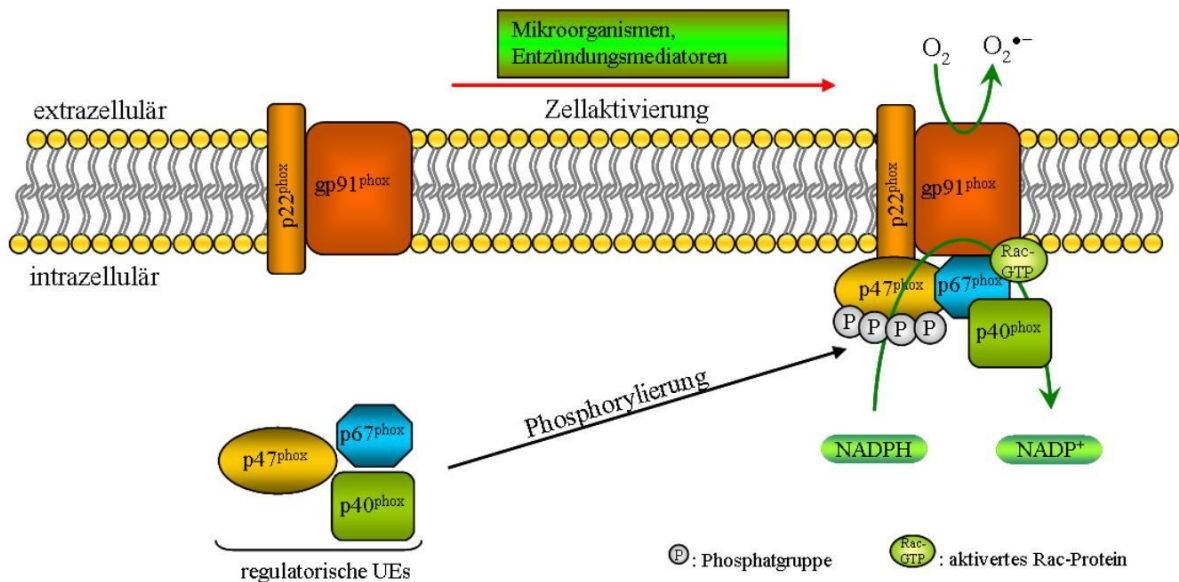


Abb. 1: Darstellung und Aktivierung der phagozytären NADPH-Oxidase [modifiziert nach Lambeth, 2004].

Durch die Phosphorylierung erfährt die $p47^{\text{phox}}$ -Untereinheit eine Konformationsänderung und nimmt daraufhin Kontakt mit der membranständigen Komponente $p22^{\text{phox}}$ auf [Groemping et al., 2003]. Die Aktivierung des GTP-bindenden Rac-Proteins bewirkt dessen Translokation zur Plasmamembran, wo es mit der $p67^{\text{phox}}$ -Untereinheit und mit dem Cytochrom b_{558} interagiert. Nach Aktivierung des NADPH-Oxidase-Komplexes bindet das Substrat NADPH auf der zytosolischen Seite an die Untereinheit $gp91^{\text{phox}}$ und setzt zwei Elektronen frei, welche über das FAD-Molekül und über die zwei Hämmoleküle aus der Zelle transportiert werden und daraufhin zwei Sauerstoffmoleküle zu Superoxid-anionradikale reduzieren (Abb. 1).

1.1.2.2 Die Isoformen der NADPH-Oxidasen

Zurzeit existieren keine Kristallstrukturanalysen der NOX-Enzyme, aber auf Grund von indirekten Daten, ist es möglich, die Core-Region der Enzyme zu modellieren. Alle Familienmitglieder besitzen sechs hochkonservierte transmembrane Domänen (Abb. 2). Die transmembranen Domänen III und V beinhalten jeweils zwei Histidinreste, zwischen denen zwei asymmetrische Hämmoleküle gespannt sind. Der zytoplasmatische C-

Terminus beinhaltet die FAD- und NADPH-Bindedomäne [Lambeth, 2002]. Die Isoform NOX5 enthält zusätzlich eine Calciumbindedomäne am N-Terminus [Banfi et al., 2001] und die dualen Oxidasen verfügen neben der Calciumbindedomäne auch über eine extrazellulär lokalisierte Peroxidasedomäne [De Deken et al., 2002].

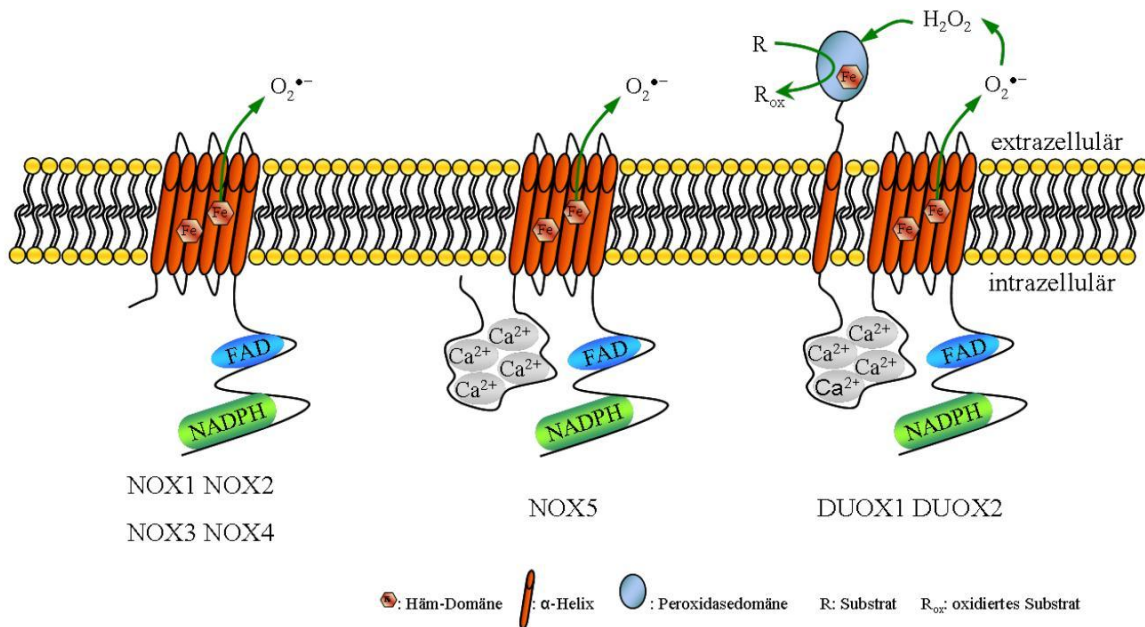


Abb. 2: Transmembrane Topologie und Struktur der NOX-Familienmitglieder.

Alle Homologe besitzen sechs transmembrane Domänen. Der C-Terminus beinhaltet eine FAD- und eine NADPH-Bindestelle. NOX5 und DUOX1/2 besitzen zusätzlich am N-Terminus eine Calciumbindestelle. Ferner besitzen die dualen Oxidasen jeweils eine transmembrane Domäne mit einer Peroxidasedomäne [Lambeth, 2004].

Das erste entdeckte homologe Protein zu NOX2 war **NOX1** [Banfi et al., 2000, Suh et al., 1999]. Die Sequenzhomologie zwischen NOX1 und NOX2 beträgt 56 % [Suh et al., 1999]. Weiterhin wurden zwei Splice-Varianten identifiziert: NOX1-L (*long transcript variant*) und NOX1-S (*short transcript variant*) [Banfi et al., 2000, Geiszt et al., 2004, Harper et al., 2005]. Neben der konstitutiven Verteilung in bestimmten Zelltypen (Tab. 1), kann NOX1 unter bestimmten Gegebenheiten induziert werden. In Muskelzellen zum Beispiel kann durch die Stimulanzen PDGF, Prostaglandin F_{2α} und Angiotensin eine Induktion der NOX1-Expression erfolgen [Katsuyama et al., 2002, Lassegue et al., 2001, Suh et al., 1999, Wingler et al., 2001].

Die Isoform **NOX2**, im vorherigen Kapitel eingehend erläutert, wird als Prototyp aller NOX Isoformen angesehen. Sie kommt aber auch in nichtphagozytotischen Zelltypen vor (Tab. 1). Wie in Abschnitt 1.1.2.1. erwähnt, wird auch in diesen Zelltypen für die Aktivierung von NOX2 eine Reihe komplexer Protein-Protein-Interaktionen vorausgesetzt.

NOX2 ist in den Zellen nicht konstitutiv aktiv, sondern wird über einen Stimulus aktiviert. So kann zum Beispiel die Aktivierung der NADPH-Oxidasen in phagozytischen Zellen über die Bindung von spezifischen Liganden an den auf der Membran exprimierten Rezeptoren erfolgen. Ebenfalls ist eine Induzierung der Genexpression möglich. Dies wurde unter anderen in Phagozyten als Antwort auf Interferon [Nakamura et al., 1991] und in Kardiomyozyten nach akutem Myokardinfarkt gezeigt [Krijnen et al., 2003].

Im Jahre 2000 wurde die Isoform **NOX3** auf Grund der Sequenzähnlichkeit zu anderen NOX-Isoformen beschrieben [Kikuchi et al., 2000]. Die ersten Studien zur Funktion des Proteins wurden erst 2004 veröffentlicht [Banfi et al., 2004, Paffenholz et al., 2004]. Die Aktivität der NOX3 ist von p22^{phox} und von der Anwesenheit der Organisatoruntereinheit NOXO1 abhängig [Banfi et al., 2004, Kawahara et al., 2005, Ueno et al., 2005]. Die Aufgabe der Aktivatoruntereinheit zur Aktivierung der NOX3 wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. Einige Studien belegen eine Erhöhung der Aktivität von NOX3 bei Anwesenheit von NOXA1 [Banfi et al., 2004, Ueyama et al., 2006], wohingegen die Studien von Cheng et al. und Ueno et al. dies nicht bestätigen [Cheng et al., 2004, Ueno et al., 2005].

Eine vierte Form der NADPH-Oxidasen stellt die **NOX4** dar. Sie kommt in der Niere vor und wurde erstmalig als RNOX (renale NOX) identifiziert [Geiszt et al., 2000]. Während NOX1, NOX2 und NOX3, evolutionär gesehen, eine relativ geschlossene Untergruppe von NADPH-Oxidaseenzymen darstellt, bildet die NOX4 eine Ausnahme. Sie weist lediglich eine Sequenzhomologie von 39 % im Vergleich mit NOX2 auf. Des Weiteren erfolgt die Aktivierung der NOX4 unabhängig von den genannten Organisator- und Aktivatoruntereinheiten, lediglich die Assoziation mit dem p22^{phox}-Protein ist essentiell [Kawahara et al., 2005, Martyn et al., 2006]. Eine Induktion der NOX4-mRNA kann zum Beispiel unter hypoxischen Bedingungen [Suliman et al., 2004] und nach Stimulation mit TGF1 (*Transforming Growth Factor 1*) und TNF (*Tumor Necrosis Factor*) erfolgen [Moe et al., 2006, Sturrock et al., 2006].

1.1.3 **Physiologische Funktionen der NADPH-Oxidasen**

Die frühzeitig entdeckten Funktionen der NADPH-Oxidase waren die Immunabwehr und Inflammation [Babior et al., 1973]. Diese Funktionen werden vorwiegend von der phagozytischen NADPH-Oxidase 2 übernommen. Diese Isoform kommt in professionellen Phagozyten und Neutrophilen vor [Babior, 1999]. Dort katalysieren sie im Verlauf des *Respiratory Burst* die Produktion von Superoxidanionen durch die Ein-Elektronen-

Reduktion von molekularem Sauerstoff. Die daraus entstehenden bakteriziden ROS sind in diesen Zellen ein erwünschter Mechanismus zur Abwehr eindringender Mikroorganismen [Babior, 1999]. In den nichtphagozytischen Zellen besitzen die NADPH-Oxidasen viele Funktionen, die sowohl pathologischer als auch physiologischer Natur sein können. Besonders Erkrankungen des vaskulären Systems werden durch reaktive Sauerstoffspezies induziert. Zu diesen Erkrankungen zählen unter anderen die Atherosklerose, Hypertonie, Diabetes, Herzinsuffizienz und kardiale Hypertrophie. In diesem Abschnitt wird allerdings vorwiegend auf einige physiologische Funktionen der NADPH-Oxidasen eingegangen. So können zum Beispiel die ROS als intrazelluläre Signalmoleküle fungieren. Der wohl am besten verstandene und möglicherweise bedeutendste Signalweg, der durch die ROS induziert wird, ist die Regulierung der Zellfunktion durch die Modifizierung von redox-sensitiven Cysteinresten. Dies wurde sehr überzeugend für die Proteintyrosinphosphatase (PTP) demonstriert [Denu and Tanner, 1998]. Die PTPs kontrollieren den Status der Phosphorylierung einer ganzen Anzahl von signalvermittelnden Proteinen und regulieren demzufolge Zellproliferation, -differenzierung, -mobilität und den Stoffwechsel der Zellen [Hunter, 2000]. In der katalytischen Region der PTPs befinden sich Cysteinreste, die schon durch geringe Mengen an H_2O_2 ($< 50 \mu\text{M}$) oxidiert werden. Die Folge dieser Reaktion ist eine transiente Inaktivierung der PTPs und führt zu einer Aktivitätserhöhung der Proteintyrosinkinasen (PTK), was schließlich zu einer Zunahme des Tyrosinphosphorylierungslevels führt [Barford, 2004, Lee et al., 1998]. Mehrere unabhängige Studien zeigen, dass NOX-abgeleitete ROS in verschiedenen Zelltypen die Phosphorylierung von Tyrosinen regulieren [Goldstein et al., 2005, Kwon et al., 2005, Wu et al., 2003, Yan and Berton, 1996]. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass Kinasen durch die ROS aktiviert werden. So führt zum Beispiel eine Behandlung von Endothelzellen mit H_2O_2 zur Phosphorylierung und Aktivierung der p38-MAPK (p38-*Mitogen activated Protein Kinase*) [Djordjevic et al., 2005]. Die genauen Mechanismen der Aktivierung der Kinasen, als Antwort auf die ROS-Produktion, sind gegenwärtig noch nicht vollständig verstanden. Die Aktivierung der Kinasen kann allerdings auch ein indirekter Effekt infolge der Inhibierung der Phosphataseaktivität durch die ROS sein [Touyz et al., 2004]. Auf Grund der eben genannten Funktionen der ROS, ist es nicht verwunderlich, dass sie bei der Regulation der Genexpression eine Rolle spielen. So wurde gezeigt, dass unter anderem die Expression des TNF- α (Tumornekrosefaktor), des TGF- β 1 (*Tumor Growth Factor*), von Angiotensin II und *Plasminogen Activator Inhibitor* 1 (PAI-1) durch NOX-abhängige ROS-Generierung induziert wird [Ha and Lee, 2005, Qin et al., 2005]. Die von der NADPH-Oxidase

abgeleiteten ROS sind weiterhin in Redoxsignalwege involviert, die in Endothelzellen zur Angiogenese führen und begleitende Prozesse initiieren, wie Proliferation, Migration, Differenzierung und Genexpression [Ushio-Fukai et al., 2002, Yamaoka-Tojo et al., 2004]. So sind die ROS in der Lage, direkt den Transkriptionsfaktor HIF (*Hypoxia Inducible Factor*) zu aktivieren, welcher die Genexpression von angiogenen Faktoren, wie dem VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), erhöht [Forsythe et al., 1996]. Angiogenese-induzierende ROS, generiert durch die Isoform NOX2, wurden in Endothelzellen und in einem Model der Ischämie gefunden [Tojo et al., 2005, Ushio-Fukai et al., 2002]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass NOX1 die Expression von VEGF in kultivierten Tumorzellen und in Tumoren erhöht. Ebenfalls war in den vaskulären Zellen von NOX1-exprimierenden Tumoren eine Erhöhung der VEGF-Rezeptoren 1 und 2 zu verzeichnen [Arbiser et al., 2002]. In der Differenzierung von embryonalen Stammzellen spielen die NADPH-Oxidasen in der Ausbildung der Blutgefäße eine wichtige Rolle, wie von Sauer et al. bewiesen. Durch Belastung von murinen embryonalen Stammzellen mit mechanischer Spannung oder elektrischen Feldern stieg jeweils der ROS-Level durch eine Hochregulation der NADPH-Oxidasen an, was eine erhöhte Expression des Endothelmarkers PECAM-1 (*Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*) zur Folge hatte [Sauer et al., 2005].

1.1.4 **Pharmakologie der NADPH-Oxidasen**

Die Inhibitoren der NADPH-Oxidasen werden in zwei Kategorien eingeteilt: (I) Peptid-Inhibitoren und (II) nichtpeptidbasierende Inhibitoren.

(I) Einer der ersten Peptidinhibitoren, der Einfluss auf die Aktivität der NADPH-Oxidase in Leukozyten nimmt, ist das Peptid **PR-39**. Dieses Prolin-Arginin-reiche Peptid blockiert die Aktivität durch Bindung an die SH3-Domäne der regulatorischen Unter-einheit p47^{phox}, wodurch die Translokation zum Cytochrom b₅₅₈ unterbunden wird [Shi et al., 1996]. Weiterhin zeigen Studien, dass PR-39 die Sauerstoffproduktion in nichtphagozytotischen Zellen inhibiert, so beobachtet in Endothelzellen von porcinen pulmonaren Arterien [Al-Mehdi et al., 1998]. Allerdings zeigen andere Studien nichtspezifische Effekte von PR-39, da das Peptid auch an SH3-Domänen anderer Proteine bindet und mit Membranlipiden interagiert [Chan et al., 2001, Tanaka et al., 2001]. Zeitgleich synthetisierte die Arbeitsgruppe um Rey das chimäre Oligopeptid **Gp91ds-tat**. Das Peptid besteht aus 18 Aminosäuren und ist in zwei funktionelle Domänen unterteilt. Die Gp91ds-Domäne beinhaltet neun Aminosäuren, die dem zytoplasmatischen Loop der NOX2

homolog sind [Rey et al., 2001]. Diese Sequenz wurde bereits in früheren Studien als „*docking sequence*“ (ds) für $p47^{phox}$ identifiziert [DeLeo et al., 1995]. Die tat-Domäne, ebenfalls eine neun Aminosäure lange Sequenz, ist vom HIV-Hüllprotein abgeleitet und gewährleistet den Eintritt des Peptides in die Zelle [Fawell et al., 1994]. *In-Vitro*-Assays zeigen, dass gp91ds-tat die Interaktion zwischen $p47^{phox}$ und $gp91^{phox}$ inhibiert [Rey et al., 2001] und in zellfreien Systemen eine Minderung der Oxidaseaktivität von bis zu 80 % beobachtet wird [DeLeo and Quinn, 1996]. Dieses Peptid wurde vorrangig für die Inhibierung der NADPH-Oxidase 2 konstruiert. Allerdings gibt es zwei Studien, die zeigen, dass gp91ds-tat auch bekannte NOX1-abhängige Reaktionen hemmt [Keller et al., 2004, Yang et al., 2005].

(II) Die bevorzugt genutzten Inhibitoren für die Inaktivierung der NADPH-Oxidaseaktivität sind jedoch die nichtpeptidischen Substanzen, charakterisiert als chemische Substanzen oder kleine Moleküle. Eine dieser Substanzen ist **Diphenyliodoniumchlorid** (DPI), das ursprünglich als Inhibitor der Gluconeogenese durch die Hemmung der mitochondrialen Substratoxidation identifiziert wurde [Holland et al., 1973]. In späteren Studien wurden weitere inhibierende Eigenschaften von DPI an anderen Flavoproteine beinhaltenden Enzymkomplexen beobachtet. So fanden Cross und Jones 1986 einen hemmenden Einfluss von DPI auf die NADPH-Oxidaseaktivität in Phagozyten [Cross and Jones, 1986]. Aber auch andere ROS-generierende Enzymsysteme, wie zum Beispiel die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) [Stuehr et al., 1991], die Xanthinoxidase und die NADPH-Cytochrom P_{450} -Oxidoreduktase, werden durch DPI gehemmt [O'Donnell et al., 1993]. Die Inhibierung der NADPH-Oxidase erfolgt durch die Abstraktion des Elektrons vom FAD durch DPI über die Bildung eines Phenylradikals. Dieses Radikal attackiert über kovalente Bindung die Flavingruppe und führt zu einer irreversiblen phenylierten Form von FAD [O'Donnell et al., 1993, O'Donnell et al., 1994]. Durch diesen Mechanismus ist keine selektive Hemmung der Aktivität der verschiedenen NOX-Isomeren gegeben. Eine andere chemische, jedoch weniger angewandete, Substanz ist **4-(2-Aminoethyl)-Benzensulfonylfluorid** (AEBSF). AEBSF, auch als Pefabloc bekannt, unterdrückt die Bindung von $p47^{phox}$ am Cytochrom b_{558} , wodurch die Zusammenlagerung des NADPH-Oxidasekomplexes verhindert wird [Diatchuk et al., 1997]. Über die Selektivität von AEBSF gibt die berücksichtigte Literatur wenig Auskunft. Eine Inhibierung der klassischen phagozytotischen NOX2-beihaltenden NADPH-Oxidase ist nachgewiesen [Diatchuk et al., 1997]. Wartenberg et al. zeigen darüber hinaus einen supprimierenden Einfluss von AEBSF auf die ROS-Produktion in NOX1-überexprimierenden Tumorzellen

[Wartenberg et al., 2005]. Möglicherweise hat AEBSF einen ähnlichen Einfluss auf die homologe Untereinheit NOXO1. Laut den Untersuchungen von Martyn et al. beeinflusst AEBSF die NOX4-beinhaltende NADPH-Oxidase nicht, da die Aktivität dieser Isoform nicht von der Untereinheit p47^{phox} abhängig ist [Martyn et al., 2006]. Unter den eingesetzten NADPH-Oxidaseinhibitoren ist **Apocynin** das am häufigsten genutzte Pharmakon. Apocynin (4-Hydroxy-3-Methoxy-Acetophenon) ist ein natürlicher Bestandteil in der Wurzel von *Picrorhiza kurroa*, der 1971 von Basu et al. isoliert wurde [Basu et al., 1971]. Die in Nepal, Indien, Tibet und Pakistan beheimatete Pflanze wird schon seit langem in der indischen Medizin gegen inflammatorische Beschwerden angewandt. Die erste Erkenntnis, dass Apocynin ein NADPH-Oxidaseinhibitor sein könnte, zeigten Simons und Mitarbeiter 1990 an Neutrophilen [Simons et al., 1990]. Aber auch in nichtphagozytotischen Zellen konnte ein inhibierender Effekt von Apocynin auf die Aktivität der NADPH-Oxidasen nachgewiesen werden [Meyer et al., 1999]. Der vorgeschlagene Mechanismus von Apocynin ist die Unterbindung der Translokation der zytosolischen Untereinheiten p47^{phox} und p67^{phox} zur membranständigen NOX-Komponente [Meyer et al., 1999, Stolk et al., 1994]. Apocynin ist ein Prodrug, dass durch Peroxidasen und Wasserstoffperoxid in den Zellen oxidiert und dadurch in das aktive Metabolit Diapocynin (5'-5'-Dimer) umgewandelt wird [Johnson et al., 2002]. Die vollständige Klärung des Mechanismus der Inaktivierung der NADPH-Oxidasen durch Apocynin ist noch zu leisten.

In der Literatur sind weitere Verbindungen beschrieben, die möglicherweise einen inhibierenden Einfluss auf die NADPH-Oxidaseaktivität besitzen. So zum Beispiel postulieren Kojima et al. einen supprimierenden Einfluss von **Neopterin** auf die Generierung von Superoxid über die Inaktivierung der NADPH-Oxidase in Phagozyten [Kojima et al., 1993]. Ding et al. postulieren, dass **Plumbagin**, ein pflanzliches Naphtoquinon, die NADPH-oxidase inhibiert [Ding et al., 2005]. Der Grund für diese Vermutung ist, dass Plumbagin im Tierexperiment antikarzinogene und antiatherosklerotische Effekte aufweist [Parimala and Sachdanandam, 1993, Sharma et al., 1991]. Diese Autoren zeigten an der Zelllinie HEK293, die hauptsächlich die Isoform NOX4 exprimiert, dass Plumbagin die Aktivität der NADPH-Oxidasen zeit- und konzentrationsabhängig hemmt. Weiterhin wurde die Superoxidanionproduktion in NOX4-überexprimierenden COS-7-Zellen durch die Gabe von Plumbagin inhibiert [Ding et al., 2005]. Als ein weiterer möglicher Kandidat zur Inhibierung der NADPH-Oxidase wird das synthetische Polyphenol **S17834** angesehen, da es die TNF-stimulierte NADPH-Oxidaseaktivität in Endothelzellen inhibiert [Cayatte et al., 2001]. Weiterhin wird in ApoE-defizienten Mäusen (Apolipoprotein E)

durch Applikation von S17834 sowohl eine Reduzierung von atherosklerotischen Läsionen als auch eine Reduzierung des Superoxidanionlevels in der Aorta beobachtet [Cayatte et al., 2001]. Auch im Falle von S17834 ist der Mechanismus weitestgehend unbekannt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Pharmakologie der NADPH-Oxidasen bis zum heutigen Zeitpunkt weder vollständig verstanden noch ausreichend untersucht wurde. Dies ist insbesondere der Tatsache geschuldet, dass die verbreitet eingesetzten Inhibitoren unspezifisch wirken.

1.2 Der *Embryoid Body* als Modellsystem für Differenzierungsprozesse

1.2.1 Murine embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen besitzen die Eigenschaft der Selbsterneuerung, sind nicht differenziert und können sich daher zu verschiedenen Zelltypen spezialisieren. Abhängig von ihrem Differenzierungspotential werden embryonale Zellen in drei Gruppen untergliedert: toti-, pluri- und multipotente Zellen. Als totipotent werden Zellen bezeichnet, die zu einem kompletten Individuum heranwachsen können. Hinsichtlich der Entwicklung von Säugtieren geht man davon aus, dass embryonale Zellen bis zum Acht-Zell-Stadium totipotent sind. Bei pluripotenten Zellen ist die Differenzierungsfähigkeit eingeschränkt. Zwar können sich diese Zellen noch in die drei Keimblätter Ektoderm, Endoderm und Mesoderm entwickeln, haben jedoch die Fähigkeit verloren, einen kompletten Organismus zu bilden. Zu den multipotenten Zellen werden die so genannten adulten Stammzellen gezählt. Sie können sich zu verschiedenen Zelltypen einer bestimmten Linie entwickeln. Im Gegensatz zu den pluripotenten Stammzellen, sind sie nicht mehr in der Lage, sich in nahezu jede Körperzelle zu entwickeln. Erkenntnisse in der Stammzellforschung deuten allerdings darauf hin, dass diese Auffassung revidiert werden muss. Offenbar besitzen multipotente Zellen eine größere Flexibilität als bislang angenommen. So können adulte Stammzellen, wenn sie in eine neue Umgebung gebracht werden, transdifferenzieren [Ferrari et al., 1998].

1.2.2 Pluripotente Stammzellen

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind drei Arten von pluripotenten Stammzellen beschrieben. Sie werden auf Grund der verschiedenen etablierten Isolierungsmethoden aus der Blastozyste in embryonale Karzinomzellen (ECC; *Embryonic Carcinoma Cells*), embryonale Keimzellen (EGC; *Embryonic Germ Cells*) und embryonale Stammzellen (ESC; *Embryonic Stem Cells*) eingeteilt (Abb. 3).

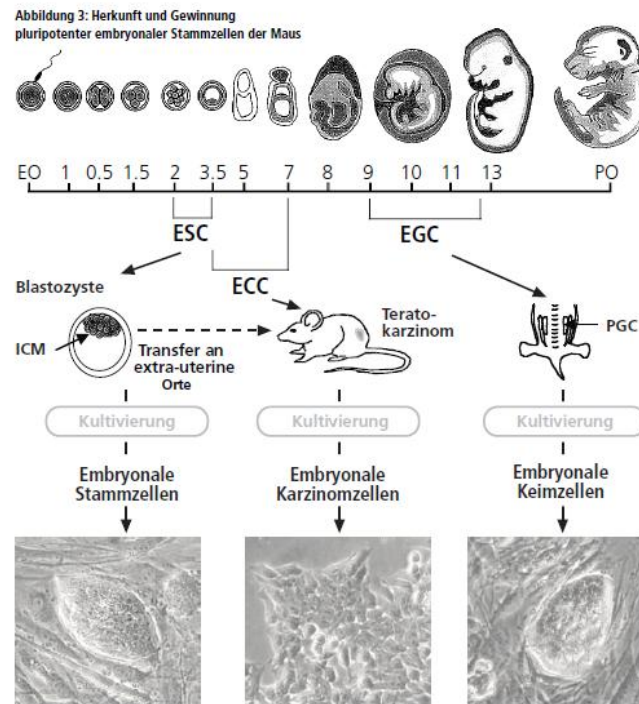


Abb. 3: Herkunft und Gewinnung pluripotenter embryonaler Stammzellen der Maus.

Dargestellt ist die Etablierung von ES-, EC- und EG-Zellen aus frühen Entwicklungsstadien der Maus [Wobus and Boheler, 2005].

Die Gewinnung von ECC wurde im Jahre 1970 etabliert [Stevens, 1970]. Die isolierten Zellen aus der Blastozyste werden zur Vermehrung in Mäuse transplantiert und aus den entstehenden Teratokarzinomzellen kann dann eine permanente Zelllinie kultiviert werden. Ihre pluripotente Fähigkeit ist allerdings sehr eingeschränkt und weisen oft einen aneuploiden Chromosomensatz auf. Anfang der 80er Jahre gelang die Etablierung permanenter Zelllinien aus undifferenzierten embryonalen Stammzellen. Diese Zellen stammen aus der inneren Zellmasse (ICM; *Inner Cell Mass*) einer maximal 3,5 Tage alten Mausblastozyste [Evans and Kaufman, 1981]. In diesem Alter besitzen die Zellen noch ihre Pluripotenz. Die dritte Methode zur Gewinnung von Stammzellen ist die Isolierung von primordialen Keimzellen aus den Vorläufern der Gonaden von abgetriebenen Föten [Matsui et al., 1991, Resnick et al., 1992]. Diese Zellen lassen sich im Labor unter bestimmten Kultivierungsbedingungen zu embryonalen Stammzellen entwickeln, die sich in ihrer Pluripotenz kaum von den ESC unterscheiden [Yu and Thomson, 2008].

1.2.3 Der *Embryoid Body*

Embryoid Bodies (EBs) sind von embryonalen Stammzellen abgeleitete, dreidimensionale Aggregate, die sich im Differenzierungsstadium befinden. Die EBs haben somit ihren Ursprung in pluripotenten ESC. Die Charakteristika dieser Zellen spiegeln sich in

ihrer nahezu unlimitierten Selbsterneuerungskapazität und der Fähigkeit zur Differenzierung über Vorläuferzellen in verschiedene somatische Zellen wieder. Um die ESC in ihrem undifferenzierten Zustand zu halten, bedarf es einer speziellen Kultivierung. Ursprünglich gelang dies, indem man die Zellen auf mitotisch inaktivierten Fibroblasten, den so genannten *feeder cells* oder Ammenzellen, in serumhaltigem Medium kultivierte [Martin, 1981]. Diese Fibroblasten sondern ein Zytokin ab, welches die Zellen im undifferenzierten Zustand hält. Dieses Zytokin wurde als *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) identifiziert und gehört zur Interleukin-6-Superfamilie. Dieser Faktor ermöglicht nunmehr eine standardmäßige Kultivierung muriner ESCs ohne Ammenzellen [Williams et al., 1988]. Die *In-Vitro*-Differenzierung der embryonalen Stammzellen und die Generierung der sphärischen EBs erfolgt in der Regel spontan nach dem Entfernen des LIF-Faktors aus dem Medium und kann entweder:

- (I) durch Kultivierung in Suspensionskultur bei hoher Zelldichte [Doetschman et al., 1985, Wartenberg et al., 1998] oder
- (II) in so genannten *Hanging Drops* (Hängenden Tropfen) [Wobus et al., 1991] oder
- (III) in methylzellulosehaltigem Medium [Wiles and Keller, 1991] erfolgen.

In diesen so erzeugten Aggregaten laufen Differenzierungsprozesse ab, die denen der frühen Embryonalentwicklung ähneln. Es entwickeln sich Zelltypen aller drei Keimblätter [Abe et al., 1996, Doetschman et al., 1985, Leahy et al., 1999]. In der zeitlichen Abfolge der Differenzierungsprozesse entwickelt sich als erstes das kardiovaskuläre System in den EBs [Hescheler et al., 1999, Wobus et al., 1995]. In frühen Stadien beginnt ebenfalls die endotheliale Differenzierung und die Angiogenese [Vittet et al., 1996, Wartenberg et al., 1998]. Weiterhin zeigen sich die Entwicklungen von glatter und quergestreifter Muskulatur [Drab et al., 1997, Rohwedel et al., 1994] und Differenzierungen zu neuronalem Gewebe, parietalem Endoderm sowie zu Knorpeln [Kramer et al., 2000, Sauer et al., 1998, Strubing et al., 1995].

1.3 Zielstellung der Arbeit

Die bearbeitete Literatur gibt Hinweise darauf, dass reaktive Sauerstoffspezies, welche aus dem Enzymkomplex NADPH-Oxidase generiert werden, die Proliferation, die Migration und die Differenzierung von Zellen, sowie die Expression von Genen beeinflussen. Jedoch sind zahlreiche Fragen offen, deren Beantwortung die nachfolgende experimentelle Arbeit nachgeht.

Ziel ist es daher, die Wirkung der NADPH-Oxidasen NOX1, NOX2 und NOX4 auf die Differenzierungsprozesse im murinen *In-Vitro*-Modellsystem CGR8 weiter aufzuklären, was zuvor erfordert, sowohl Vorkommen als auch Expressionsmuster der NOX1, NOX2 und NOX4 und der regulatorischen Untereinheiten p47^{phox}/NOXA1 und p67^{phox}/NOXO1 innerhalb eines definierten Entwicklungszeitraumes darzustellen. Für die Klärung, ob und welche NADPH-Oxidasen in die Differenzierungsprozesse des CGR8-Modellsystems eingreifen, werden zwei unabhängige experimentelle Strategien verfolgt:

1. Pharmakologische Untersuchungen

sollen unter Verwendung von DPI, Apocynin und AEBSF die Aktivität der NADPH-Oxidasen in den CGR8-Zellen hemmen und

2. Nutzung der shRNA-Technik,

wobei die Etablierung von CGR8-ES-Zelllinien, in denen die Expression der NADPH-Oxidasen NOX1, NOX2 und NOX4 mittels shRNA supprimiert wird, im Vordergrund stehen soll.

Die Experimente verfolgen das spezielle Ziel, die kardiale und die vaskuläre Differenzierung im CGR8-Modellsystem darzustellen, wobei übliche Methoden der Zellbiologie und der Molekularbiologie genutzt werden, um typische Differenzierungsmarker zu untersuchen. Ferner soll geklärt werden, ob bestimmte Isoformen der NADPH-Oxidase eine bevorzugte Rolle in diesen Differenzierungsprozessen spielen.

2 Material

2.1 Zelllinien

4T1	ATCC, Manassas (USA)
CGR8	ECACC, Salisbury (UK)
HEK293T (Phoenix-gp-Zellen)	ATCC, Manassas (USA)

2.2 Bakterien

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. Coli</i> K12 DH5 α	F ⁻ Φ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 <i>endA1 recA1 relA1 gyrA96 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 tonA</i>	Sigma-Aldrich, München

2.3 Laborgeräte

Axiovert 40	Carl Zeiss AG, Jena
Beckman-Zentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
CellSpinSystem	IntegraBiosciences GmbH Fernberg
Elektrophoreseeinheit	VWR International GmbH, Darmstadt
Elektrophoreseeinheit	Biorad, München
HERAcell CO ₂ Inkubator	KENDRO/Thermo Scientific, Karlsruhe
HERAsafe [®] KSP Class II Bio-safety Cabinets	KENDRO/Thermo Scientific, Karlsruhe
LAS-3000 (Luminescent Image Analysis System)	Fujifilm, Düsseldorf
Laserscanningmikroskop 510META	Carl Zeiss AG, Jena
Mastercycler [®] ep realplex	Eppendorf AG, Hamburg
Mastercycler [®] gradient,	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrowelle	VWR International GmbH, Darmstadt
Mini Trans-Blot Cell	Biorad, München
Minizentrifuge Galaxie	VWR International GmbH, Darmstadt
Nanodrop-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
ObserverZ1 mit ApoTome-Einheit	Carl Zeiss AG, Jena
Pipetboy acu	IntegraBiosciences GmbH Fernberg
Power supply	VWR International GmbH, Darmstadt
PowerPac Basic power supply	Biorad, München
Ultraschall-Homogenisator SONOPLUS	BANDELIN electronic GmbH, Berlin
Wärmeplatte Hot plate 062	Labotect GmbH Göttingen
Wasserbad	VWR, Darmstadt
Zentrifuge Biofuge Primo R	KENDRO/Thermo Scientific, Karlsruhe

2.4 Verbrauchsmaterialien

Bakterielle Petrischalen (\varnothing = 60 mm und 100 mm)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
CapStrips	Eppendorf AG, Hamburg
Cryo.sTM Einfrierröhrchen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Deckgläser, rund (\varnothing = 6 mm und 60 mm)	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Filtertips (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l)	Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe
Falconröhrchen (15 ml und 50 ml)	BD Falcon, Heidelberg
Multiwellplatten (6-, 12- und 24-well)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1 ml),	Eppendorf AG, Hamburg
Protran [®] nitrocellulose membrane	Schleicher und Schüll GmbH, Mannheim
QIAshredder	Qiagen GmbH, Hildesheim
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Spritzen (5 ml und 10 ml)	Braun, Melsungen

Sterilfilter (0,2 µm)
TwinTec PCR plate96
Wathman-3mm-Papier
Zellkulturflaschen (T25 & T75)
Zellkulturschalen (ø = 60 mm)

Satorius, Göttingen
Eppendorf AG, Hamburg
Biometra GmbH i. L., Göttingen
TPP, Trasadingen (CH)
Greiner Bio-one, Frickenhausen

2.5 Medien/Medienzusätze

Basal ISCOVE
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle' Medium)
FBS (Fetales bovine serum)
GMEM (Glasgow Minimal Essential Medium)
L-Glutamin
LIF (ESGRO)
Natriumpyruvat
NEA (*non essential amino acids*)
Penicillin/Streptomycin
β-Mercaptoethanol

Biochrom AG, Berlin
Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, München
Biochrom AG, Berlin
Biochrom AG, Berlin
Millipore, Schwalbach/Ts
Biochrom AG, Berlin
Biochrom AG, Berlin
Biochrom AG, Berlin
Sigma-Aldrich, München

2.6 Chemikalien/Reagenzien/Kits

10 mM dNTP Mix
Aceton
Acrylamid/Bisacrylamid
AEBSF
Agarose
Ampicillin
Apocynin
Aprotinin
Blocking Reagenz
Bradford-Reagenz
Bromphenolblau
BSA
Celltracker CMFDA
DCF
DHE
Dithioreitol (DTT)
DMSO (Dimethylsulfoxid)
DNase I, Amplification Grade
DPI
ECL Blocking Agent
ECL Western Blotting Detection Reagents
EDTA
EndoFree Plasmid Midi Kit
Ethanol
Ethidiumbromid
FullRange Rainbow Marker
Gelatine
Glucose
Glycerin
Jumpstart
Ladepuffer (6 x)
LB-Agar
LB-Medium
Leupeptin
Methanol

Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Carl Roth, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, München
Sigma-Aldrich, München
MoBiTec GmbH, Göttingen
Sigma-Aldrich, München
Sigma-Aldrich, München
Sigma-Aldrich, München
Sigma-Aldrich, München
Amersham Bioscience, München
Sigma-Aldrich, München
Sigma-Aldrich, München
Sigma-Aldrich, München
Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, München
Sigma-Aldrich, München
Sigma-Aldrich, München
Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, München
Amersham Bioscience, München
Amersham Bioscience, München
Sigma-Aldrich, München
Qiagen GmbH, Hildesheim
Carl Roth, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, München
Amersham Bioscience, München
Sigma-Aldrich, München
Carl Roth, Karlsruhe
Carl Roth, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, München
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, München
Carl Roth, Karlsruhe

Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, München
Nukleasefreies Wasser	Promega, Mannheim
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
PBS (ohne Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
PepstatinA	Sigma-Aldrich, München
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, München
Polybrene	Sigma-Aldrich, München
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich, München
Ponceau	Sigma-Aldrich, München
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, München
Puromycin	Sigma-Aldrich, München
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hildesheim
Randomprimer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hildesheim
Rotenon	Sigma-Aldrich, München
Rotiphorese Gel30	Carl Roth, Karlsruhe
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, München
SuperScript II, Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TEMED	Sigma-Aldrich, München
Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypton	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween20	MERCK, Darmstadt

2.7 Antikörper

Erster Antikörper				
Spezifität	Verdünnung	Isotyp	Applikation	Firma
Polyklonal-anti-Gp91 ^{phox}	1:50/1:200	Ziege IgG	IF/WB	Santa Cruz
Polyklonal-anti-MOX1	1:50/1:200	Ziege IgG	IF/WB	Santa Cruz
Polyklonal-anti-NOX4	1:50/1:200	Ziege IgG	IF/WB	Santa Cruz
Monoklonal-anti-Pecam-1	1:200	Ratte IgG _{2akappa}	IF	Chemicon
Monoklonal-anti-CD31	1:1000	Maus IgG	WB	Abcam
Monoklonal-anti-heavy chain cardiac Myosin	1:200/1:1000	Maus IgG	IF/WB	Abcam
alpha actinin	1:1000	Maus IgM	WB	Abcam
Polyklonal-anti-GAPDH	1:5000	Kaninchen IgG	WB	Abcam
Zweiter Antikörper				
Spezifität	Konjugat	Verdünnung	Applikation	Firma
Maus IgG	HRP	1:10000	WB	Abcam
Maus IgG	Cy3 TM	1:100	IF	Chemicon
Ratte IgG	Cy5 TM	1:100	IF	Chemicon
Kaninchen IgG	HRP	1:10000	WB	Santa Cruz
Ziege IgG	HRP	1:10000	WB	Santa Cruz
Ziege IgG	Cy5 TM	1:100	IF	Chemicon

IF: Immunofluoreszenz; WB: Western Blot

2.8 Oligonukleotide

Die Sequenzen der zu untersuchenden Gene wurden aus der Internetdatenbank www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/Nucleotide entnommen. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in RNase freies Wasser aufgenommen und auf eine Stammkonzentration von 100 pm/μL eingestellt. Die Stammlösung wurde für die PCR in nukleasefreiem Wasser im Verhältnis 1 : 100 verdünnt.

Name	Sequenz 5'→ 3'	T _a [°C]	Fragmentgröße [bp]
NOX1	s: TCCATTTCTTCCTGGAGTG as: CCCAACCAGTACAGCCACTT	60	216
NOX2	s: ACTGCGGAGAGTTTGGAAGA as: GGTGATGACCACCTTTTGCT	60	201
NOX4	s: GATCACAGAAGGTCCCTAGCA as: GTTGAGGGCATTACCAAGT	60	134
p47 ^{phox}	s: GTGGAGAAGAGCGAGAGCGG as: TCCTCTTCAACAGCAGCGTA	60	173
p67 ^{phox}	s: GCAGTGGCCTACTTCCAGAG as: CTTTCATGTTGGTTGCCAATG	60	243
NOXO1	s: ACCCAAACCTCTGGATCTGG as: CAGACCTTCCACACCAAGG	60	185
NOXA1	s: AGACCGGAGGATTTGGACTT as: AAGCATGGCTTCCACATAGG	60	153
MMP9	s: CGTCGTGATCCCCACTTACT as: AACACACAGGGTTTGCCCTTC	60	225
MMP2	s: GTTGGCAGTGCAATACCTGA as: GCGGGGGAAGAAGTTGTAGT	60	202
PECAM	s: CAGGTGTGCGAAATGCTCT as: ATGGGTGCAGTTCATTTC	60	113
beta-MHC	s: CTACAGGCCTGGGCTTACCT as: TCTCCTTCTCAGACTTCCGC	61	126
MLC2v	s: AAAGAGGCTCCAGGTCCAAT as: CCTCTCTGCTTGTGTGGTCA	61	177
Polr2a	s: GACAAAACCTGGCTCCTCTGC as: GCTTGCCCTCTACATTCTGC	60	142

s: sense; as: antisense

2.9 Plasmide

pGV
pLKO.1
pMDL/pRRE
pRSV-Rev
pVSV-GNJ

Bereitstellung durch J. Müller
Sigma-Aldrich, München
Addgene, Cambridge (USA)
Addgene, Cambridge (USA)
Bereitstellung durch J. Müller

2.10 MISSION®-shRNA (Sigma-Adlrlich, München)

Anmerkung: pLKO.1-Derivate, welche shRNA-Gene mit folgender Sequenz tragen:

Name	Sequenz des shRNA-Inserts
NADPH Oxidase 4 Mission® shRNA	
shRNA-NOX4-1 TRCN0000076583	ccgggcatcaataaccacctgtat ctcgag atacaggtggtatttgatgcttttg
shRNA-NOX4-2 TRCN0000076584	ccgggccagtataatttctccatt ctcgaga atggagaataataactggcttttg
shRNA-NOX4-3 TRCN0000076585	ccggcctacgcaataagagtttct ctcgag tagaaactctattgcgtaggttttg
shRNA-NOX4-4 TRCN0000076586	ccgggcattagcttaaccagacat ctcgag atgtctggttaagactaatgcttttg
shRNA-NOX4-5 TRCN0000076587	ccgggccagaataactactacattca ctcgag tgaatgtagtagtattctggcttttg
NADPH Oxidase 2 Mission® shRNA	
shRNA-NOX2-1 TRCN0000011888	ccgggctgccaaatgtcccagtaat ctcgag attactgggacatttggcagctttt
shRNA-NOX2-2 TRCN0000011889	ccggcctgcctgaattcaactgtat ctcgag tacagttgaaattcaggcaggtttt
shRNA-NOX2-3 TRCN0000011890	ccggccaagttagaatggcacacat ctcgag atgtgtgccattctaacttggtttt
shRNA-NOX2-4 TRCN0000011891	ccggcggagagtttggagagcata ctcgag tatgctcttccaaactctccgtttt
shRNA-Nox2-5 TRCN0000011892	ccgggctggaaactacctaagata ctcgag tatcttaggtagttccaggctttt
NADPH Oxidase 1 Mission® shRNA	
shRNA-NOX1-1 TRCN0000076598	ccgggcatggaagtaggacagtata ctcgag tatactgtcctacttccatgcttttg
shRNA-NOX1-2 TRCN0000076600	ccggcgtgattaccaagggtgtcat ctcgag atgacaaccttggtaatcacgttttg
shRNA-NOX1-3 TRCN0000076601	ccgggaaagaagattcttggtctaa ctcgag tttagccaagaatcttcttcttttg
shRNA-NOX1-4 TRCN0000076599	ccggcttgaaatctatctggtacaa ctcgag ttgtaccagatagatttcaagttttg

2.11 Software

AxioVision
LAS Software
LSM510
MultiGauge V3.0
Realplex

Carl Zeiss AG, Jena
Fujifilm, Düsseldorf
Carl Zeiss AG, Jena
Fujifilm, Düsseldorf
Eppendorf AG, Hamburg

3 Methoden

3.1 Zellkulturmethoden

Die Zelllinien und alle mit ihnen hergestellten Ansätze für Experimente wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert.

3.1.1 Die Stammzelllinie CGR8

Die CGR8-Zelllinie ist eine embryonale Stammzelllinie der Maus, die aus der inneren Zellmasse eines männlichen dreieinhalb Tage alten Präimplantationsembryos (*Mus musculus*, Stamm129) etabliert wurde. Diese pluripotenten Zellen besitzen die Fähigkeit eine teilweise normale embryonale Entwicklung zu nehmen. Die Differenzierung der CGR8-Zellen wird durch das pleiotrophe Cytokin DIA (*Differentiation Inhibiting Activity*) inhibiert. Dieses Cytokin ist identisch zu LIF. Durch Zugabe von LIF zur Zellkultur ist eine feederfreie Kultivierung der CGR8-ES-Zellen im undifferenzierten Zustand möglich.

3.1.1.1 Kultivierung der undifferenzierten CGR8-ES-Zellen

Die undifferenzierten CGR8-ES-Zellen wurden zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Vor der Kultivierung der Zellen wurde ein Zellaliquot bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden in 5 ml Zellkulturmedium bei 37 °C aufgenommen und für die Dauer von 4 min bei 800 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in LIF-haltigem GMEM-Medium resuspendiert und in eine gelatinebeschichte 25T-Zellkulturflasche übergeführt. Der Mediumwechsel erfolgte jeden Tag. Nach zwei bis drei Passagen konnten die Zellen für die Spinnerkultur (Kap. 3.1.1.2) bzw. für die Differenzierungsexperimente verwendet werden.

3.1.1.2 Die Spinnerkultur – Differenzierung in *Embryoid Bodies* (EBs)

Die Spinnerkulturtechnik fand Anwendung, wenn aus der zweidimensionalen Ebene, wie es die Monolayerkultur darstellt, in die dritte Dimension übergegangen wurde. Diese 3D-Kultur stellt eine Suspensionskultur dar, in der die Zellen im Medium schweben und durch die ständige Bewegung des Mediums keine Möglichkeit haben, sich adsorptiv am Kulturgefäß anzureichern. Sie sind gezwungen Zell-Zell-Kontakte untereinander einzugehen, dabei entstehen aus einzelnen Zellen kompakte Sphäroide, die EBs [Wartenberg et al., 1998]. Das Passagieren der CGR8-ES-Zellen erfolgte bei einem Zelldichtegrad von 70 % - 80 %. Nach Entfernen des Mediums, wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA-

Lösung gewaschen und für den Zeitraum von 1 min - 2 min bei $T = 37\text{ °C}$ mit Trypsin/-EDTA inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einer Pipette vereinzelt und durch Zugabe von 4 ml eines serumhaltigen Mediums die proteolytische Reaktion des Trypsins gestoppt. Die Zellen wurden danach mit einer Dichte von 10×10^6 Zellen in eine Spinnerflasche übergeführt, die zuvor mit 125 ml komplettiertem *Basal Iscove*-Medium befüllt wurde. Nach einer Kultivierungszeit von 24 h wurde die Flasche auf ein Endvolumen von 250 ml aufgefüllt. Der Mediumwechsel erfolgte täglich. Die Kultivierung der CGR8-EBs in der Spinnerflasche erfolgte im Brutschrank unter Verwendung eines Magnetrührers bei einer Drehzahl von 22,5 U/min und einem Richtungswechsel jeweils nach vier Umdrehungen. Um den Gasaustausch mit der Umgebungsluft des Inkubators zu gewährleisten, wurden die Deckel der Flaschen aufgedreht.

3.1.2 Die Tumorzelllinie 4T1

Die Tumorzelllinie 4T1 leitet sich aus einem Tumor des Brustdrüsengewebes von BALB/cfC₃H Mäusen ab und besitzt den Metastasierungsgrad IV [Aslakson and Miller, 1992].

3.1.2.1 Kultivierung der Zelllinie 4T1

Die Kultivierung der 4T1-Zellen erfolgte in 75T-Zellkulturflaschen. Die kryogenisierten Zellen wurden bei einer Temperatur von 37 °C aufgetaut, in 5 ml warmes DMEM-Medium übergeführt und bei 800 g für 4 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Medium resuspendiert und in die Zellkulturflasche eingefüllt, welche 15 ml Medium enthielt. Der Mediumwechsel erfolgte täglich. Bei einem Zelldichtegrad von 70 % - 80 % wurden die Zellen passagiert, wobei vor dem Passagieren ein Spülschritt mit Trypsin/-EDTA-Lösung erfolgte, anschließend wurden die Zellen drei bis fünf Minuten mit 2 ml Trypsin/EDTA bei $T = 37\text{ °C}$ inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden zur weiteren Vereinzelung resuspendiert und in 4 ml Medium aufgenommen. Die Weiterkultivierung der Zellen erfolgte entweder in 75T-Zellkulturflaschen oder als Suspensionskultur in Spinnerflaschen (Kap. 3.1.2.2).

3.1.2.2 Kultivierung der 4T1-Zellen als 3D-Kultur

Zur Kultivierung der Zelllinie 4T1 als Sphäroide in Spinnerflaschen wurden die Zellen trypsiniert, wie in Kap. 3.1.2.1 beschrieben. Eine Gesamtzellzahl von 10×10^6 wurde in die Spinnerflasche übergeführt, in welcher zuvor 125 ml Medium vorgelegt wurde. Nach 24 h wurde die Spinnerflasche auf ein Endvolumen von 250 ml aufgefüllt.

Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank unter Verwendung eines Magnetrührer bei einer Drehzahl von 20 U/min und einem Richtungswechsel nach jeweils vier Umdrehungen.

3.1.3 Die Konfrontationskultur

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von Zellen nach Inhibierung der NADPH-Oxidaseaktivität wurden Konfrontationskulturen aus CGR8-EBs und 4T1-Sphäroiden angesetzt.

Für die Konfrontationskultur wurden CGR8-EBs mit einem Alter von vier oder sechs Tagen verwendet, während das Alter der 4T1-Sphäroide sechs oder acht Tage betrug. Vor der Konfrontation der beiden unterschiedlichen Zelllinien wurden die 4T1-Sphäroide mit dem Langzeitfarbstoff CMFDA (5-Chloromethylfluoresceindiazetat), zu ihrer späteren Unterscheidung, behandelt. Hierfür wurden die 4T1-Sphäroiden in eine bakteriologische Petrischale übergeführt und mit 10 μ M CMFDA-Lösung für die Dauer von 60 min bei $T = 37^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit DMEM-Medium konnten die 4T1-Sphäroide für die Konfrontationskultur verwendet werden. Jeweils ein CGR8-EB und ein 4T1-Sphäroid wurden in einem Tropfen mit 30 μ l Iscove's Medium, welche zuvor auf die Unterseite des Deckels einer 10 cm Petrischale pipettiert wurden, zusammengebracht. Die untere Schale der Petrischale wurde mit 10 ml PBS befüllt, um einer Verdunstung der Tropfen vorzubeugen. Die Konfrontationskulturen wurden nach einer Dauer von 24 h im hängenden Tropfen auf gelatinebeschichtete Glasplättchen in einer 24-Wellplatte ausplattiert.

3.1.4 Die Helferzelllinie HEK293T

In dieser Arbeit wurde die Zelllinie HEK293T als Helferzelllinie für die Transduktionsexperimente verwendet (Kap. 3.4.6). HEK293T-Zellen sind Derivate der Zelllinie HEK293, in deren Genom das temperatursensitive Gen *Large T Antigen* des *Simian Virus 40* (SV40) integriert wurde. Aufgrund ihrer stabilen Expression des *SV40 Large T Antigen* zeichnen sich diese Zellen durch eine besonders gute Transduzierbarkeit aus. Plasmide, die eine SV40-kodierende Sequenz enthalten, werden in einer HEK293T Zelle 400- bis 1000-fach repliziert und weisen somit eine höhere Expressionsrate auf [Pear et al., 1993].

3.1.4.1 Kultivierung der Zelllinie HEK293T

Die Kultivierung der Zellen HEK293T erfolgte in DMEM Medium. Der Mediumwechsel wurde jeden zweiten Tag vorgenommen. Bei einer Zelldichte von 80 % - 90 %

wurden die Zellen trypsinisiert und im Verhältnis 1 : 8 verdünnt. Für die Transduktionsexperimente wurden die Zellen in 6-Wellplatten mit einer Zelldichte von $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät. Die Methodik der Transfektion wird ausführlich im Kap. 3.4.6 beschrieben.

3.1.5 Behandlung der CGR8-EBs mit pharmakologischen Substanzen

Um den Effekt der pharmakologischen Substanzen auf die Differenzierung der CGR8-Zellen zu untersuchen, wurden diese am vierten Tag der Differenzierung mit den Substanzen inkubiert. In Tab. 2 sind die verwendeten Stammlösungen der NADPH-Oxidaseinhibitoren und von Rotenon, einem Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette, aufgeführt.

Tab. 2: Die verwendeten pharmakologischen Substanzen

Substanz	C _{Stammlösung} [mM]
Diphenyliodonium (DPI)	10
Apocynin	100
AEBSF	100
Rotenon	10

3.2 Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

3.2.1 Detektion der ROS mit Dichlorofluorescein (DCF)

Nach Zugabe der unpolaren, nicht fluoreszierenden Substanz 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate (H₂DCF-DA) zu den Zellen diffundiert diese durch die Zellmembran in das Innere der Zelle. Durch intrazelluläre Esterasen erfolgt die hydrolytische Abspaltung der Acetatgruppe. Das entstandene, nicht fluoreszierende H₂DCF besitzt nun eine höhere Polarität und kann die Zellmembran nicht mehr durchdringen. Das H₂DCF wird durch vorhandene intrazelluläre ROS zum Fluorochrom Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert [Hempel et al., 1999]. Durch Anregung des DCF mit einer Wellenlänge von 488 nm kann die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 525 nm detektiert werden.

In den Experimenten wurden die CGR8-EBs, unter abgedunkelten Bedingungen, für einen Zeitraum von 20 min mit einer Konzentration von 20 μ M H₂DCF-DA in E1-Puffer behandelt. Nach dem Waschen in E1-Puffer wurde sofort die Fluoreszenz des DCF bei einer Wellenlänge von 488 nm mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop (cLSM) gemessen. Die Intensität der Fluoreszenz des DCF gilt als Indikator für die intrazelluläre Produktion von ROS.

3.2.2 Detektion der ROS mit Dihydroethidium (DHE)

Eine weitere Methode für den Nachweis der Radikalbildung in CGR8-EBs ist die Nutzung des redoxsensitiven Farbstoffes Dihydroethidium (DHE). DHE ist selektiv für die Messung von Superoxidanionen [Kobzik et al., 1990]. Die Substanz wird nach Aufnahme in die Zellen durch vorhandene Sauerstoffradikale zu Oxy-Ethidium oxidiert, welches in die DNA interkaliert und so zur Fluoreszenzverstärkung führt.

Als Stammlösung wurde eine Konzentration von 20 mM verwendet, welche aliquotiert unter Argon bei T = -20 °C gelagert wurde. Die DHE-Stammlösung wurde in E1-Puffer auf eine Konzentration von 20 µM verdünnt und bei T = 37 °C für einen Zeitraum von 20 min zu den CGR8-EBs gegeben. Nach dem Waschen in E1-Puffer folgte erneut eine Inkubation von 20 min und im Anschluss daran wurde die Fluoreszenz mit dem cLSM bei einer Wellenlänge von 488 nm detektiert.

3.3 Immunofluoreszenzfärbung

3.3.1 Fixierung und Antikörperfärbung

Abhängig vom Targetprotein wurden die in PBS gewaschenen CGR8-EBs entweder in einer Methanol/Aceton-Lösung (Verhältnis: 7 : 3) einstündig bei T = -20 °C oder in 4 % PFA-Lösung (Paraformaldehyd) ebenfalls einstündig bei T = 4 °C fixiert und anschließend dreimal mit 0,01 % PBS-T gewaschen. Die Zellmembranen wurden für intrazellulär lokalisierte Antikörper mit 1 % PBS-T für einen Zeitraum von 10 min bei Raumtemperatur (RT) permeabilisiert. Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen in 0,01 % PBS-T. Die Inkubation der CGR8-EBs mit 10 % Milchpulver in 0,01% PBS-T für einen Zeitraum von 60 min bei RT blockierte die unspezifischen Antikörperbindestellen. Die primären Antikörper wurden auf die entsprechenden Arbeitskonzentrationen (Kap. 2.7) in 0,01 % PBS-T + 10 % Milchpulver verdünnt und bei T = 4 °C über Nacht auf den Zellen unter schütteln belassen. Nach Beendigung der primären Antikörperinkubation erfolgte ein dreimaliges Waschen in 0,01 % PBS-T. Der jeweilige sekundäre Antikörper wurde ebenfalls auf die richtige Arbeitskonzentration (Kap. 2.7) gebracht. Die Inkubationszeit der CGR8-EBs mit dem zweiten Antikörper erfolgte bei RT über zwei Stunden im abgedunkelten Raum. Nach den Waschschritten (3 x 10 min) erfolgte die Detektion der angefärbten CGR8-EBs mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop. Die entsprechenden Anregungs- und Detektionswellenlängen der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tab. 3 wiedergegeben.

Tab. 3: Fluoreszenzfarbstoffe und -proteine

Fluorophor/Fluoreszenzfarbstoff/ Fluoreszenzprotein	Anregungswellenlänge	Detektion
Cy3 TM	543 nm	560 nm – 650 nm
Cy5 TM	633 nm	649 nm – 745 nm
CMFDA	488 nm	517 nm
GFP	488 nm	505 nm – 550 nm

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der RNA aus den CGR8-EBs wurde das RNeasyMiniKit[®] (Qiagen) verwendet. Für jede Probe wurden 20 bis 25 CGR8-EBs für die Isolierung der Gesamt-RNA eingesetzt. Die CGR8-EBs wurden mit PBS gewaschen, um das restliche Medium zu entfernen. Die Lyse der CGR8-EBs erfolgte mit dem Lysispuffer RLT aus dem RNeasy Mini Kit. Durch Auf- und Abpipettieren wurde die Lyse der Zellen zusätzlich vorangetrieben. Das Lysat wurde entweder bei T = -80 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet, in dem es auf eine Shreddersäule übergeführt und für die Dauer von 2 min bei einer Drehzahl von 13000 U/min zentrifugiert wurde. In diesem Schritt erfolgte die Trennung der Zellreste (z.B. Zellmembranen) von den Nukleinsäuren. Das gereinigte Lysat wurde mit 70 % Ethanol im Volumenverhältnis 1 : 1 dehydratisiert. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte durch Adsorption an einer hydratisierten Silicagelmembran in einer speziellen Zentrifugationssäule (RNeasy Spin Column, Qiagen). Kontaminationen wurden durch Waschschriffe und Zentrifugation mit den entsprechenden Lösungen des Herstellers eliminiert. Die adsorbierte RNA wurde in 25 µl RNase-freiem Wasser mittels Zentrifugation rehydratisiert und eluiert. Die RNA wurde bei T = -80 °C gelagert.

3.4.2 Quantifizierung der Ribonukleinsäuren

Die Quantifizierung der isolierten RNA und der Plamid-DNA erfolgte bei einer Absorption (A) von 260 nm mit dem NanoDrop-Gerät. Dabei entspricht eine OD (optische Dichte)-Einheit einer Konzentration von 40 µg/ml RNA bzw. 50 µg/ml DNA. Die Qualität der isolierten RNA wurde über den Quotienten $1,7 < A_{260}/A_{280} < 2,0$ bestimmt.

3.4.3 RNA-Gelelektrophorese

Die isolierte RNA wurde zusätzlich mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Dieser Schritt diente dazu, die Integrität der RNA zu überprüfen. Von der isolierten RNA wurde 1 µl Aliquot mit 5 µl Wasser und 1 µl Ladepuffer zusammengeführt und auf ein 2 %iges Agarosegel, welches den DNA-Interkalationsfarbstoff Ethidiumbromid enthielt, aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer elektrischen Spannung von 120 V und einer Laufzeit von einer Stunde. Die Intaktheit der RNA wurde anhand der Banden der ribosomalen RNA (18S- und 28S-Bande) unter UV-Licht kontrolliert.

3.4.4 cDNA-Synthese

Für die Synthese der cDNA wurde das Kit SuperScript® der Firma Invitrogen verwendet. Zunächst wurde eine RNA-Lösung mit 2 µg RNA in einem Volumen von 10 µl hergestellt. Um eine mögliche Kontamination der eingesetzten RNA mit genomischer DNA auszuschließen, wurde vor der cDNA-Synthese ein DNA-Verdau unter Verwendung des Enzyms DNase I, Amplification Grade, durchgeführt. Der Reaktionsansatz sowie die -bedingungen für den Verdau sind in Tab. 4 aufgeführt. Der DNA-Verdau wurde mit EDTA gestoppt und es erfolgte die Denaturierung der RNA (Reaktionsansatz 2). Nach Beendigung der Reaktion wurden die Proben auf T = 4 °C abgekühlt und der Reaktionsansatz 3 hinzugefügt (Tab. 4).

Tab. 4: Reaktionsansätze und -bedingungen zur Herstellung von cDNA

Reaktionsansatz 1		Reaktionsansatz 2		Reaktionsansatz 3	
Komponenten	V	Komponenten	V	Komponenten	V
DNase I	1 µl	EDTA	1 µl	5 x Buffer	4 µl
10 x Buffer	1 µl	10 mM dNTP	1 µl	DTT	2 µl
		Randomprimer	1 µl	Wasser	1 µl
add 2 µl/Probe		add 3 µl/Probe		add 7 µl/Probe	
Reaktionsbedingungen					
Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
RT	15 min	65 °C	5 min	25 °C	2 min

Im Anschluss wurde 1 µl des Enzyms SuperScript II Reverse Transkriptase zu dem Reaktionsgemische gegeben. Die Umschreibung erfolgte unter den in Tab. 5 aufgeführten Reaktionsbedingungen.

Tab. 5: Reaktionsbedingungen zur endgültigen Herstellung von cDNA

Temperatur	Zeit
25°C	10 min
70°C	50 min
15°C	15 min
4°C	∞

Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die cDNA bei $T = -20\text{ °C}$ gelagert.

3.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ist eine Methode, die die spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten mit bekannter Sequenz flankierender Bereiche ermöglicht [Mullis et al., 1986]. Im Umfang dieser Arbeit wurde die Methode zur Analyse und Semiquantifizierung der Genexpression im Zuge einer RT-PCR (*reverse transcription-PCR*) eingesetzt.

3.4.5.1 Konventionelle PCR

Die konventionelle PCR wurde für die Testung der Oligonukleotide sowie zur Überprüfung der cDNA-Synthese eingesetzt. Für die Amplifizierung der DNA-Fragmente wurde das JumpStart™ REDTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix verwendet. In diesem Kit sind die benötigten Komponenten bereits enthalten. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Kap. 2.8 mit den Sequenzen sowie deren Annealingtemperatur (T_a) und der Länge des amplifizierten DNA-Abschnittes tabellarisch niedergeschrieben. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tab. 6 aufgeführt.

Tab. 6: PCR-Reaktionsansatz

Komponenten	Menge
cDNA	1 μl
Primer forward ($C_{\text{end}} = 3\text{ }\mu\text{M}$)	1 μl
Primer reverse ($C_{\text{end}} = 3\text{ }\mu\text{M}$)	1 μl
Jumpstart™	10 μl
Wasser	7 μl
Reaktionsvolumen:	20 μl

C_{end} : Endkonzentration

Die Amplifizierung der cDNA erfolgte im Gerät Mastercycler® Gradient der Firma Eppendorf AG. Die Reaktionsbedingungen sind in Tab. 7 aufgelistet.

Tab. 7: PCR-Reaktionsbedingungen

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit/Dauer
Erstdenaturierung	94 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	30 sec
Annealing	60 °C	30 sec
Elongation	72 °C	1 min
Elongation	72 °C	2 min
Abkühlung	4 °C	∞

Die PCR-Produkte wurden nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 2 %igen Agarosegel mit Ethidiumbromid unter UV-Licht überprüft. Als Elektrophoresepuffer diente 1 x TBE-Puffer.

3.4.5.2 Real-time PCR

Die semiquantitative Bestimmung der transkribierten RNA erfolgte über die Real-time PCR mit dem Mastercycler[®] ep realplex-Gerät. Für die Detektion der amplifizierten Fragmente wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®]-Green verwendet. Dieser Fluorophor interkaliert sequenzunabhängig in dem DNA-Doppelstrang. Durch die kontinuierliche Messung der Fluoreszenzintensität, die proportional zur Menge des gebildeten Amplifikationsproduktes ansteigt, kann direkt die synthetisierte DNA-Menge verfolgt werden. Nach der PCR wurde eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Über die Analyse des Schmelzpunktes kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei der amplifizierten DNA um ein unspezifisches Produkt, z. B. aus Verunreinigungen des PCR-Ansatzes oder um Primerdimere handelt.

Für die Analyse der Transkripte wurde der QuantiFast SYBRGreen-PCR Kit (Qiagen) verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tab. 8 aufgelistet.

Tab. 8: Real-Time PCR-Reaktionsansatz

Komponenten	Menge
cDNA	1 µl
Primer forward ($C_{\text{end}} = 3 \mu\text{M}$)	1 µl
Primer reverse ($C_{\text{end}} = 3 \mu\text{M}$)	1 µl
QuantiFast SYBRGreen-PCR Kit	10 µl
Wasser	7 µl
Reaktionsvolumen:	20 µl

Die Reaktionsbedingungen zur Amplifizierung der cDNA sowie die Bedingungen zur Erstellung der Schmelzkurve sind in Tab. 9 zusammengefasst.

Tab. 9: Real-Time PCR-Bedingungen

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit/Dauer
Erstdenaturierung	94 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	10 sec
Annealing	60 °C	30 sec
Elongation	72 °C	1 min
Elongation	72 °C	2 min
Schmelzkurve	95 °C	} 40 Zyklen
	60 °C	
	95 °C	
Abkühlung	4 °C	∞

Zur relativen Quantifizierung der Daten wurde die Delta Delta C_t -Methode ($\Delta\Delta C_t$) nach Livak and Schmittgen angewandt [Livak and Schmittgen, 2001].

3.4.6 shRNA-Technik

Von der Firma Sigma-Aldrich wurden MISSION TRC Bakterienstämme erworben, welche bereits mit den entsprechenden shRNA-Konstrukten transformiert waren. Die transformierten *E. coli*-Stämme mit den Verpackungsplasmiden wurden von Dr. Jörg Müller (Institut für Molekulare Zellbiologie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena) zur Verfügung gestellt.

3.4.6.1 Kultivierung der transformierten *E. coli*-Stämme und Plasmidisolierung

Die Selektion der transformierten *E. coli*-Zellen erfolgte durch Ausstreichen auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten. Diese wurden über 12 h bei $T = 37\text{ °C}$ inkubiert. Von den gewachsenen Einzelkolonien wurde eine zum Animpfen einer LB-Medium-Vorkultur mit einem Volumen von 10 ml und einer Konzentration von 100 µg/l Ampicillin verwendet. Die Kultivierung erfolgte für einen Zeitraum von mindestens 10 h bei $T = 37\text{ °C}$ und einer Schüttelfrequenz von 250/min. Für die Kultivierung im Schüttelkolben wurde aus der Vorkultur 0,1 ml Zellsuspension entnommen und in 50 ml LB-Selektionsmedium gegeben. Das Wachstum erfolgte über Nacht bei $T = 37\text{ °C}$ und einer Schüttelfrequenz von 250/min. Die Übernachtskultur wurde für einen Zeitraum von 30 min bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde mit dem EndoFree Plasmid Midi Kit nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte wie unter Kap. 3.4.2 beschrieben.

3.4.6.2 Produktion der lentiviralen Partikel

Für die Viruspartikelherstellung wurde die Verpackungszelllinie HEK293T verwendet. Hierbei handelt es sich um eine transiente Transduktion. Die Zellen sezernieren die replikationsinkompetenten Viruspartikel, mit denen die Targetzelllinie CGR8 stabil transduziert wurde, um ein „*gene silencing*“ der NADPH-Oxidaseuntereinheiten NOX1, NOX2 und NOX4 zu erreichen. Für die Produktion der lentiviralen Partikel wurden zunächst 3×10^5 bis 5×10^5 HEK293T-Zellen/Vertiefung einer 6-Wellplatte ausgesät. Die Kultivierungszeit betrug $t = 24$ h unter Zellkulturbedingungen. Die Transfektion mit den lentiviralen Helfer-/Verpackungsvektoren (pMDL, pRSV und pVSV) und dem entsprechenden shRNA-Vektor (pLKO.1-shRNA) erfolgte mit Hilfe des kationischen Polymers Polyethylenimin (PEI). Die DNA-PEI-Komplexe werden effizient von den Zellen aufgenommen. Das Transfektionsgemisch wurde in zwei Reaktionsgefäßen angesetzt. Im ersten Reaktionsgefäß wurde die PEI-Arbeitslösung aus 1,4 µl PEI-Stammlösung ($C = 10$ µg/µl) und 250 µl DMEM-Komplettmedium (ohne FBS) hergestellt. Im zweiten Gefäß wurde die DNA-Plasmid-Lösung mit insgesamt 5,4 µg DNA-Gesamtmenge (2 µg pLKO-shRNA, 2 µg pMDL, 1 µg pRSV und 0,4 µg pVSV) und 250 µl DMEM-Komplettmedium (ohne FBS) angesetzt. Die zwei Ansätze wurden zusammengeführt, gemischt und für eine halbe Stunde bei RT inkubiert. Den HEK293T-Zellen wurde das Medium genommen und durch die DNA-PEI-Transfektionslösung und 1,5 ml DMEM-Komplettmedium (ohne FBS) pro Vertiefung ersetzt. Nach einem Inkubationszeitraum von vier bis acht Stunden wurde das Transfektionsgemisch von den Zellen entfernt und durch frisches DMEM-Komplettmedium ersetzt.

3.4.6.3 Ernte der virushaltigen Überstände

Die Ernte der sezernierten Viruspartikel erfolgte 24 h und 48 h nach Beginn der Transduktion der Zellen. Hierfür wurde der Mediumüberstand mit einer Spritze aufgenommen und durch einen 0,2 µm-Sterilfilter filtriert. Hierdurch wurden die Produzenten-zellen und deren Überreste aus dem virushaltigen Überstand entfernt. Der Virusüberstand wurde entweder direkt für die Transfektionsexperimente verwendet oder in 1 ml Aliquoten bei $T = -80$ °C gelagert.

3.4.6.4 Transduktion der embryonalen Stammzelllinie CGR8 und Selektion

Die gefrorenen Virusüberstände wurden bei $T = 37$ °C aufgetaut und auf die Zielzellen gegeben. Für die stabile Transfektion der undifferenzierten CGR8-Zellen wurden diese zuvor mit einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/Vertiefung in eine 6-Wellplatte ein-

gesät. Nach einem Kultivierungstag wurden auf die Zellen 2 ml frisches Medium, 500 µl Virusüberstand sowie 20 µl Polybrene ($C = 8 \mu\text{g/ml}$) gegeben und zentrifugiert (50 U/min, $t = 60 \text{ min}$, $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Das Viruslysate wurde 12 h nach der Infektion von den Zellen entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Die Selektion der Zellen erfolgte nach 24 h mit einer Konzentration von $2 \mu\text{g/ml}$ Puromycin über einem Zeitraum von zehn bis zwölf Tagen.

3.5 Proteinanalytik mittels Western Blot-Analyse

3.5.1 Proteinisolierung

Für die Herstellung von Proteinlysaten wurden 20 bis 30 CGR8-EBs aus der Kultur entnommen. Nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die CGR8-EBs mit Homogenisationspuffer versetzt. Dem Puffer wurden zuvor Protease- und Phosphataseinhibitoren hinzugesetzt, um die Proteine vor dem Abbau durch diese Enzyme zu schützen (siehe Anhang). Die Zellen wurde vor der mechanischen Lyse mit dem Ultraschall-Homogenisator mit einem Pestel homogenisiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte im Eisbad unter Anwendung von Ultraschall (60 sec, 2 Zyklen, 40 % Leistung). Um die Zelltrümmer aus dem Zytosol zu entfernen, wurden die Lysate bei $T = 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ für $t = 20 \text{ min}$ bei einer Umdrehung von 16000 U/min zentrifugiert. Die Zytosole wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei $T = -80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

3.5.2 Proteinbestimmung nach BRADFORD

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den gewonnenen Zytosolextrakten (Kap. 3.5.1) erfolgte mit der photometrischen Methode nach BRADFORD [Bradford, 1976]. Der Trimethylfarbstoff Coomassie Brilliantblau G-250 komplexiert mit den kationischen, nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine. Die ungebundene Form des Farbstoffes besitzt sein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 470 nm. Nach der Komplexbildung mit Proteinen verschiebt sich das Maximum dieses Spektrums zu 595 nm [Compton and Jones, 1985]. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann gegen das freie Farbreagenz gemessen werden und ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration ist die Erstellung einer Eichkurve notwendig. Als Standardprotein wurde BSA (*Bovine Serum Albumin*) verwendet. Hierzu wurde aus einer BSA-Stammlösung ($C = 10 \text{ mg/ml}$) eine Verdünnungsreihe im Bereich bis 1 mg/ml in Stufen von $0,2 \text{ mg/ml}$ hergestellt. Die Zytosole wurden vor der Messung mit Homogenisationspuffer so verdünnt, dass ihr Proteingehalt im linearen Bereich der

Eichgeraden lag. Von den Standardkonzentrationen und den verdünnten Zytosolen wurden jeweils 20 µl in eine 96-Wellplatte pipettiert. Nach Zugabe von 180 µl Bradfordreagenz pro Well wurde die Absorption der Lösung nach einer Inkubationszeit von $t = 10$ min spektrophotometrisch gemessen. Die Proteinkonzentration der Zytosole wurde durch lineare Regression der BSA-Eichgeraden ermittelt.

3.5.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese – SDS-PAGE

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele nach Lämmli verwendet [Laemmli, 1970].

3.5.3.1 Herstellung von Trenn- und Sammelgelen

Die Acrylamidkonzentration im Trenngel ist von der molekularen Größe der zu detektierenden Proteine abhängig. Für Proteine, die ein Molekulargewicht größer 80 kDa aufweisen wurde ein 10 %iges und für Proteine mit niedrigerem Molekulargewicht ein 12 %iges Trenngel verwendet (Tab. 10).

Tab. 10: Komponenten und deren benötigte Menge für ein Trenngel (10 bzw. 12 %)

Acrylamidkonzentration in %	10 %	12 %
Acrylbisacrylamid (Rotiphorese Gel30)	3,75 ml	4,50 ml
TRIS-HCl, 1,5 mM, pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml
SDS (10 %)	150 µl	150 µl
H ₂ O	7,20 ml	6,45 ml
APS	150 µl	150 µl
TEMED	10 µl	10 µl
Gesamtvolumen	15 ml	15 ml

Für ein 3 %iges Sammelgel (5 ml) benötigt man 0,75 ml Rotiphorese Gel30, 1,25 ml TRIS-HCL (Konzentration: 0,5 mM, pH 6,8), 50 µl 10 %ige SDS-Lösung, 2,9 ml H₂O, 50 µl APS-Lösung und 3,33 µl TEMED.

3.5.3.2 SDS-Page

Die Minigelplatten (BioRad) wurden vor der Gelherstellung mit 70 % Ethanol von Fettresten gereinigt und in die Gelgießapparatur eingespannt. Anschließend wurde so viel Trenngel eingefüllt, dass ca. 2 cm unter dem oberen Rand frei blieben. Zur Vermeidung von Kanteneffekten wurde das Gel mit Wasser überschichtet. Nach dem Auspolymeri-

sieren wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Zur Erzeugung der Geltaschen wurde der Probenkamm in das Sammelgel eingesetzt. Nach Auspolymerisierung des Sammelgels wurde das Gel in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoreseapparatur eingespannt und der Kamm entfernt. Vor der Trennung der Proteinproben in der SDS-PAGE wurden diese mit SDS-Ladepuffer versetzt und bei $T = 95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für eine Dauer von $t = 10\text{ min}$ denaturiert. Nach Auftragung der Proben auf das Gel, erfolgte die Elektrophorese zunächst bei einer konstanten elektrischen Spannung von $U = 80\text{ V}$ bis zum Erreichen des Trenngels, dann wurde die Spannung auf $U = 130\text{ V}$ erhöht. Für die nachfolgende Identifizierung der Proteinbanden wurde zusätzlich $4\text{ }\mu\text{l}$ RainBow-Molekulargewichtsmarker mit definierten Proteinen aufgetragen.

3.5.4 Elektrotransfer und Immunodetektion

Der Transfer der aufgetrennten Proteine vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte nach der Methode von Towbin et al. mit Hilfe einer Transblot-Zelle (BioRad) in Blotting-Puffer bei einer konstanten Stromstärke von $I = 250\text{ mA}$ für einen Zeitraum von drei bis vier Stunden [Towbin et al., 1979]. Dazu wurde das Gel in Blotting-Puffer äquilibriert, anschließend auf eine Membran gelegt, mit Whatman-Papier und Schwämmen von beiden Seiten bedeckt und in die Transblot-Zelle eingespannt. Während des Transfers wurde das Blotsystem mittels eines Kühlaggregats gekühlt. Nach Beendigung des Transfers wurden die Proteine mit Ponceau-Färbelösung angefärbt, um die Qualität des Transfers und der Proteine zu überprüfen. Die Entfärbung der Membran erfolgte in $1\times\text{ Net-G-Puffer}$. Um die freien Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde sie für eine Stunde in $10\times\text{ Net-G-Puffer}$ bei RT inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in geeigneter Verdünnung (in $1\times\text{ Net-G-Puffer}$, Kap. 2.7) auf die Membran gegeben und eine Stunde bei RT oder bei $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in $1\times\text{ Net-G-Puffer}$ erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (Kap. 2.7) für eine Stunde bei RT. Nach dreimaligem Waschen der Membran erfolgte die Visualisierung der HRP-gekoppelten sekundären Antikörper mit dem *Enhanced Chemilumineszenz System* (ECL). Für die Detektion wurde die Membran mit einer Mischung aus ECL Reagenz A und ECL Reagenz B (Verhältnis $1 : 1$) für eine Minute im Dunkeln inkubiert und mit dem Detektionssystem LAS (*Luminescent Image Analysis System*) visualisiert.

Die Expositionszeit lag je nach Antikörper zwischen $30\text{ s} < t < 600\text{ s}$.

3.5.5 Strippen der Membran

Die Membranen können einer weiteren Immunodetektion unterzogen werden. Bevor dies möglich ist, muss der vorhandene Antikörperkomplex aus Primär- und Sekundärantikörpern entfernt werden. Dies erfolgt durch eine dreißigminütige Inkubation in Strippingpuffer bei $T = 56\text{ °C}$ und dreimaligem Waschen in 1x Net-G-Puffer. Nach dieser Behandlung kann die Membran erneut einer Immunodetektion zugeführt werden (Kap. 3.5.4).

3.6 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels des Student's t -Test oder one-way ANOVA bestimmt. Statistische Signifikanz wurde zu $p < 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Expression der NOX-Untereinheiten in CGR8-Embryoid Bodies

4.1.1 Die katalytischen Untereinheiten NOX1, NOX2 und NOX4

Für die Untersuchung des Einflusses der NADPH-Oxidasen auf die Differenzierung der murinen CGR8-ES-Zelllinie, wurde zunächst der Basallevel der katalytischen Untereinheiten NOX1, NOX2 und NOX4 in einem Zeitraum von vierzehn Tagen ermittelt. Die katalytischen Untereinheiten der Isoformen NOX3 und NOX5 wurden hierbei nicht berücksichtigt. Die Isoform NOX3 konnte in den CGR8-EBs nur marginal bis gar nicht nachgewiesen werden. Die Isoform NOX5 hingegen kommt in humanen Endothelzellen vor, wurde aber bisher noch nicht in Rodentia identifiziert [BelAiba et al., 2007].

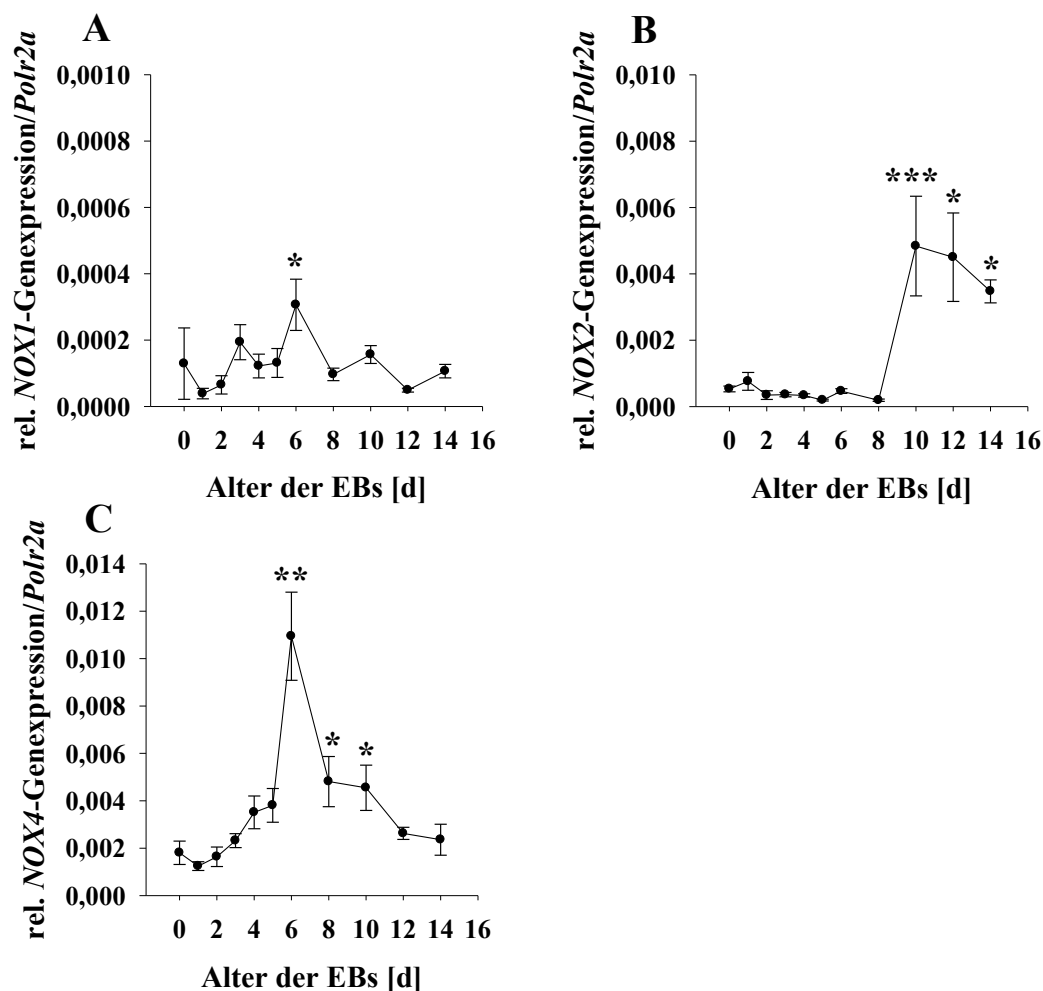


Abb. 4: Charakterisierung der katalytischen Untereinheiten NOX1, NOX2 und NOX4 in CGR8-EBs während eines Differenzierungszeitraumes von 14 Tagen.

Relatives mRNA-Expressionsniveau der katalytischen Untereinheiten *NOX1* (A), *NOX2* (B) und *NOX4* (C) in CGR8-EBs. Die Daten wurden mittels Real-Time PCR erhoben und auf die Expression des „Housekeeping“-Genes Polymerase2a (*Polr2a*) normalisiert. Dargestellt sind MW \pm SD. n = 3 - 5. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (one-way ANOVA).

Die Expression der *NOX1*-Isoform auf mRNA-Ebene in CGR8-EBs zeigte einen ersten Gipfelpunkt am dritten Tag der Differenzierung. Bezogen auf die Expression am ersten Tag war die Expression von *NOX1* am dritten Tag fünffach höher. Im weiteren Verlauf der Differenzierung kam es am sechsten Tag zu einem signifikanten Anstieg der *NOX1*-mRNA. Im Vergleich zum ersten Tag der Differenzierung war ein achtfacher Anstieg zu beobachten (Abb. 4 **A**). In den ersten acht Tagen war das Auftreten der *NOX2*-mRNA sehr gering. Ab dem zehnten Tag der Differenzierung war eine drastische Erhöhung des *NOX2*-Genexpressionslevels zu verzeichnen (Abb. 4 **B**). Bei der Untersuchung der *NOX4* zeigte sich innerhalb des gewählten Differenzierungszeitraumes von 14 Tagen ein steter Anstieg der mRNA. Am sechsten Tag der Differenzierung war der Gehalt an mRNA in den CGR8-EBs sechsfach erhöht, im Vergleich zu den undifferenzierten CGR8-Zellen (Abb. 4 **C**).

Der Nachweis des Basallevels der NOX1, NOX2 und NOX4 auf Proteinebene während eines definierten Differenzierungszeitraumes erfolgte mittels Immunofluoreszenzfärbung und der Western Blot-Analyse.

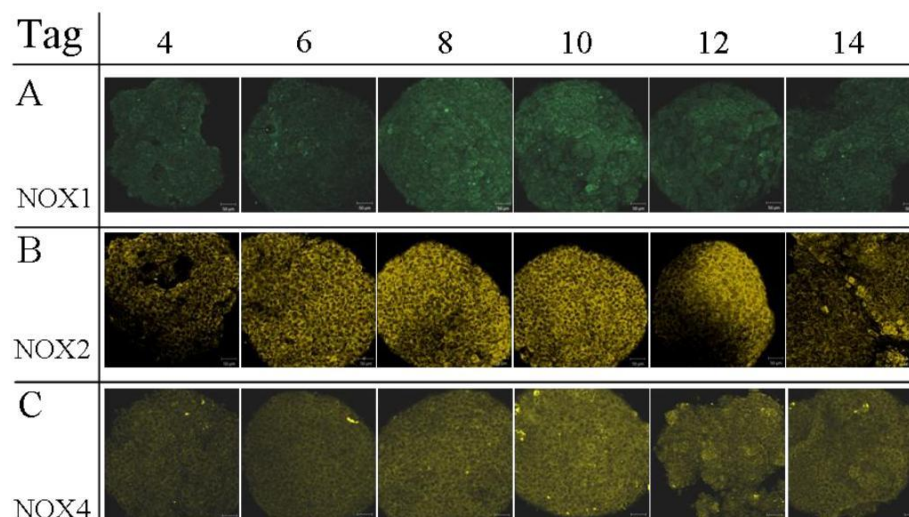


Abb. 5: Charakterisierung der katalytischen Untereinheiten NOX1, NOX2 und NOX4 mittels cLSM.

Nachweis der katalytischen Untereinheiten NOX1 (**A**), NOX2 (**B**) und NOX4 (**C**) in PFA-fixierten CGR8-EBs während eines Differenzierungszeitraumes von 14 Tagen in der Spinnerkultur. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten. Balken entspricht 5 μ m.

Die Untereinheiten wurden ab dem vierten Tag alle zwei Tage mit dem cLSM detektiert (Abb. 5). Die Betrachtung der Untereinheit NOX1 zeigte am achten und zehnten Tag stärkere Fluoreszenzsignale als an den Vortagen und in der Zeit danach (Abb. 5 **A**). Bei NOX4 sah man eine stete Zunahme der Fluoreszenz, die am zehnten Tag ihren Höhepunkt erreichte. Am 12. und 14. Tag war jedoch wieder eine Abnahme des Fluoreszenz-

signals zu verzeichnen (Abb. 5 C). Das zeitliche Auftreten von NOX2 in den CGR8-EBs ist in Abb. 5 B dargestellt.

Für die Western Blot-Analyse wurden ab dem zweiten Tag alle zwei Tage bis zum 14. Tag Proteinproben entnommen und elektrophoretisch in der SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Membran erfolgte die Detektion der katalytischen Untereinheiten mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern.

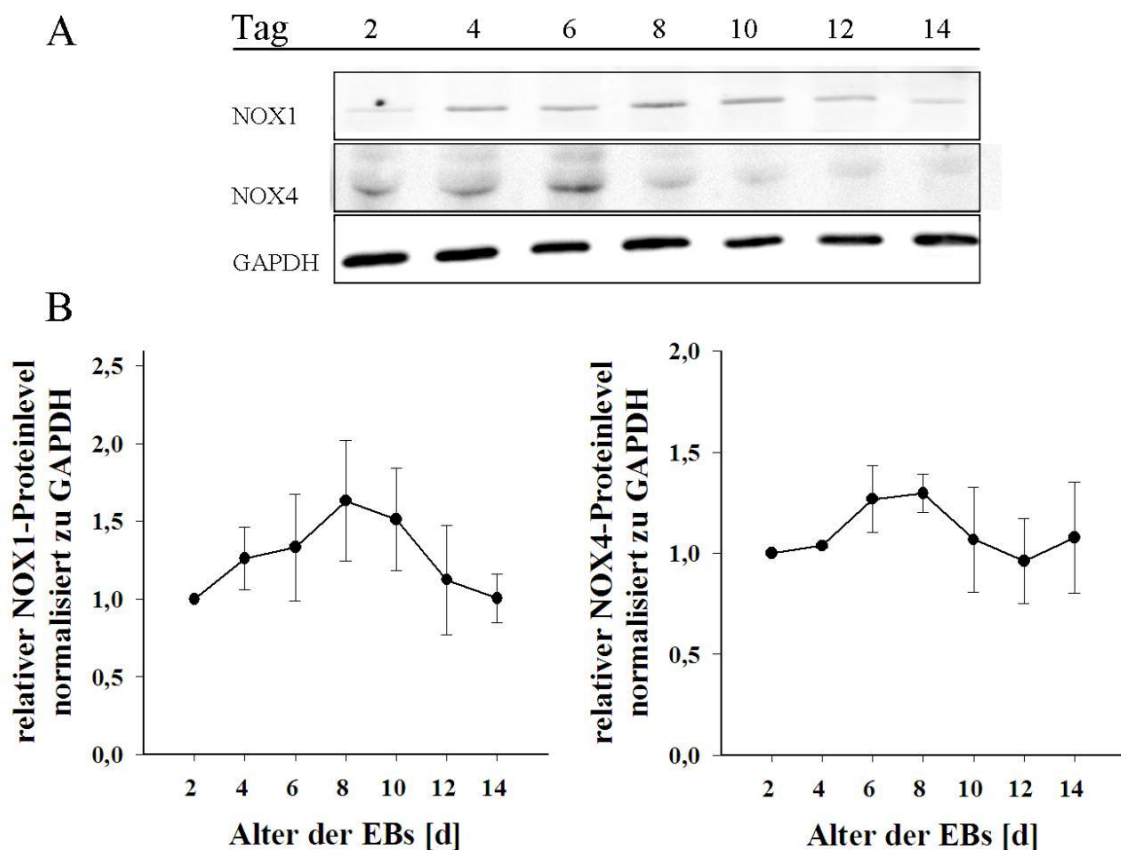


Abb. 6: Charakterisierung des Proteinlevels der katalytischen Untereinheiten NOX1 und NOX4.

(A) Dargestellt ist das zeitliche Auftreten von NOX1 und NOX4 im CGR8-EBs. Repräsentative Blots. (B) Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung für NOX1 (**links**) und NOX4 (**rechts**). Dargestellt sind $MW \pm SD$. $n = 3$. Als Ladekontrolle wurde das Protein GAPDH nachgewiesen.

Abb. 6 A zeigt repräsentative Western Blots als Funktion des zeitlichen Auftretens der NOX1- und NOX4-Proteine in den CGR8-EBs. Die densitometrische Auswertung der Blots zeigt, dass sowohl der Proteinlevel von NOX1 (Abb. 6 B **links**) als auch von NOX4 (Abb. 6 B **rechts**) am achten Tag maximal ansteigt.

4.1.2 Die regulatorischen Untereinheiten

Die enzymatische ROS-Quelle NADPH-Oxidase ist ein Komplex, dessen vollständige Funktion in der richtigen Kombination der Untereinheiten zum Tragen kommt. Im vorherigen Abschnitt 4.1.1. wurde das Auftreten der katalytischen Untereinheiten während der Differenzierung von murinen ES-Zellen gezeigt. Das Vorkommen der regulatorischen Untereinheiten $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, NOXO1 und NOXA1 wurde ebenfalls in einem Differenzierungszeitraum der CGR8-EBs von 14 Tagen untersucht.

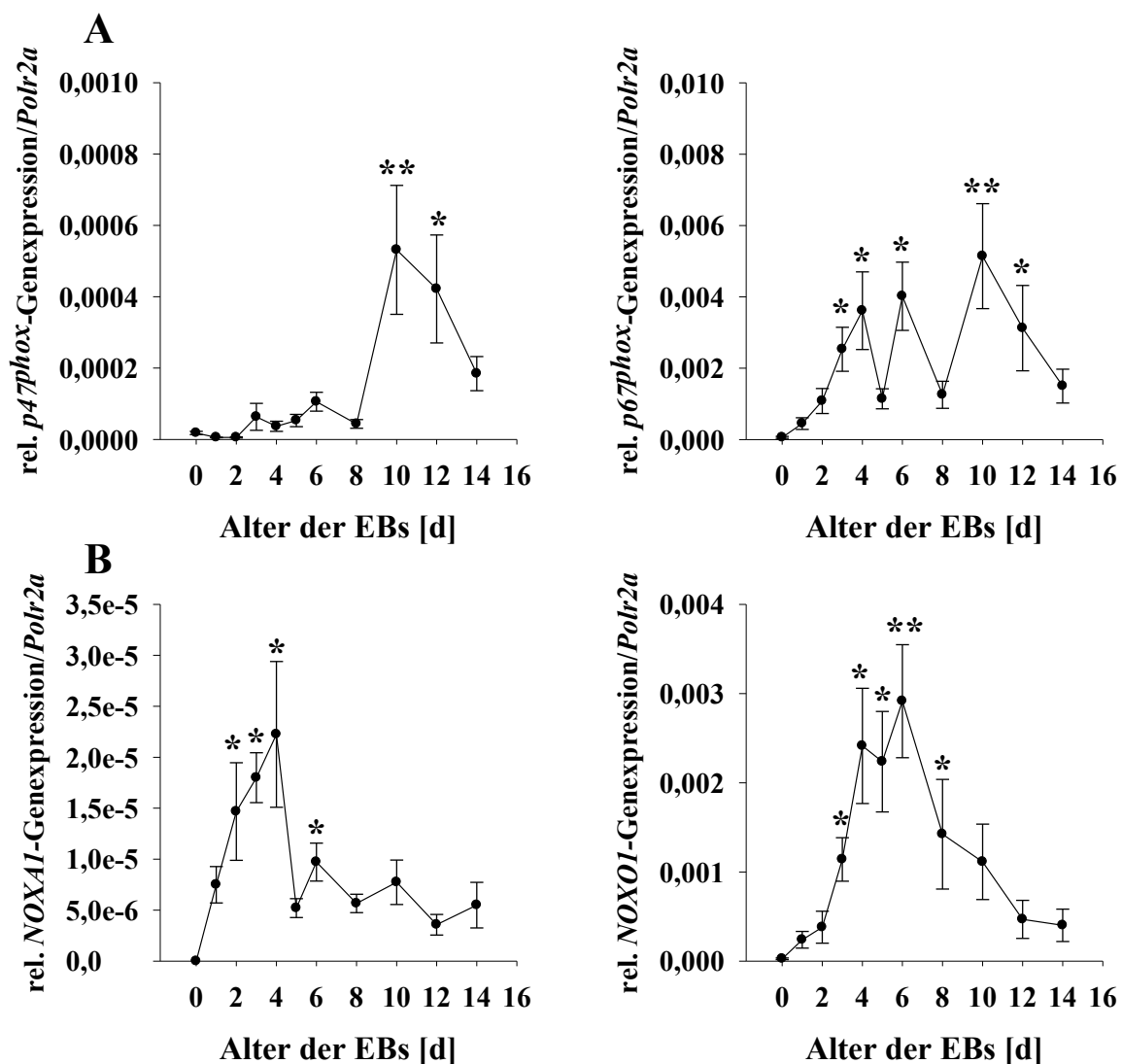


Abb. 7: Charakterisierung der regulatorischen Untereinheiten der NADPH-Oxidasen.

Relatives mRNA-Expressionsniveau der regulatorischen Untereinheiten (A) $p47^{phox}$ und $p67^{phox}$; (B) *NOXA1* und *NOXO1* in CGR8-EBs während eines Differenzierungszeitraumes von 14 Tagen. Die Daten wurden mittels Real-Time PCR erhoben und auf die Expression des *Polr2a* normalisiert. n = 3 - 5. *p < 0,05, **p < 0,01 (one-way ANOVA).

In Abb. 7 A ist das Auftreten der Untereinheiten $p47^{phox}$ und $p67^{phox}$ dargestellt, welche bei der Aktivierung des NADPH-Oxidasekomplexes 2 eine Rolle spielen. Während

des zeitlichen Verlaufes wurde sowohl bei $p47^{phox}$ als auch bei $p67^{phox}$ ein signifikantes Maximum am zehnten Tag erreicht. Diese Beobachtung korreliert mit dem zeitlichen Auftreten der katalytischen Untereinheit NOX2 (Abb. 4 B). Vergleicht man den zeitlichen Verlauf der Expression von $p47^{phox}$ mit dem von NOX2, so fällt auf, dass sich die beiden Kurven sehr ähneln. Bis zum achten Tag war die Expression der beiden Transkripte gleichbleibend, erst am zehnten Tag erfolgte ein steiler Anstieg des Expressionsniveaus. Im Falle von $p67^{phox}$ verläuft die Expression anders, hier war bereits ein signifikanter Anstieg am vierten Tag der Differenzierung im Vergleich zum undifferenzierten Zustand zu beobachten (Abb. 7 A). Die homologen Untereinheiten NOXA1 und NOXO1 wurden ebenfalls einer Zeitstudie unterzogen (Abb. 7 B). Für die NOXA1-mRNA wurde ein signifikantes Maximum am vierten Tag der Differenzierung beobachtet. Das Transkript NOXO1 erreichte mengenmäßig im Vergleich zur undifferenzierten Kontrolle sein Maximum am sechsten Tag. Beiden Transkripten war jedoch der steile Anstieg zu Beginn der Differenzierung gemeinsam, während nach Erreichen des jeweiligen Maximums, für NOXA1 am vierten Tag und für NOXO1 am sechsten Tag, der mRNA-Gehalt in den CGR8-EBs wieder abnahm.

4.2 Migrationsstudie an Konfrontationskulturen

Zur Untersuchung des Einflusses von NADPH-Oxidaseinhibitoren auf das Migrationsverhalten wurde auf das Modellsystem der Konfrontationskulturen zurückgegriffen. Hierbei handelt es sich um ein System, das aus zwei unterschiedlichen Zelltypen besteht [Wartenberg et al., 2001]. In der vorliegenden Arbeit wurden 4T1-Tumorzellen mit den sich differenzierenden CGR8-EBs im hängenden Tropfen konfrontiert (Kap. 3.1.3).

Die KoKus wurden am ersten Tag ihrer Kultivierung mit den NADPH-Oxidaseinhibitoren DPI (10 μ M) und Apocynin (100 μ M) behandelt und auf gelatinebeschichteten Glasplättchen ausplattiert. Die Migration der 4T1-Zellen in den CGR8-EBs wurde nach 24 h, 48 h und 72 h Behandlung mit den pharmakologischen Substanzen mikroskopisch dokumentiert. In der oberen Reihe der Abb. 8 ist das Migrationsverhalten der 4T1-Zellen (grün) in den CGR8-EB ohne Einfluss von pharmakologischen Substanzen zu sehen. Als Funktion der Zeit ist zu erkennen, dass die 4T1-Zellen in die CGR8-EBs eindringen. Die Behandlung der Konfrontationskulturen mit den Substanzen DPI und Apocynin unterbindet die Einwanderung der 4T1-Zellen in die CGR8-EBs. Bereits nach einem Behandlungszeitraum von 24 h mit den oben genannten Substanzen war ein stark vermindertes Migrationsverhalten der 4T1-Zellen zu beobachten (Abb. 8).

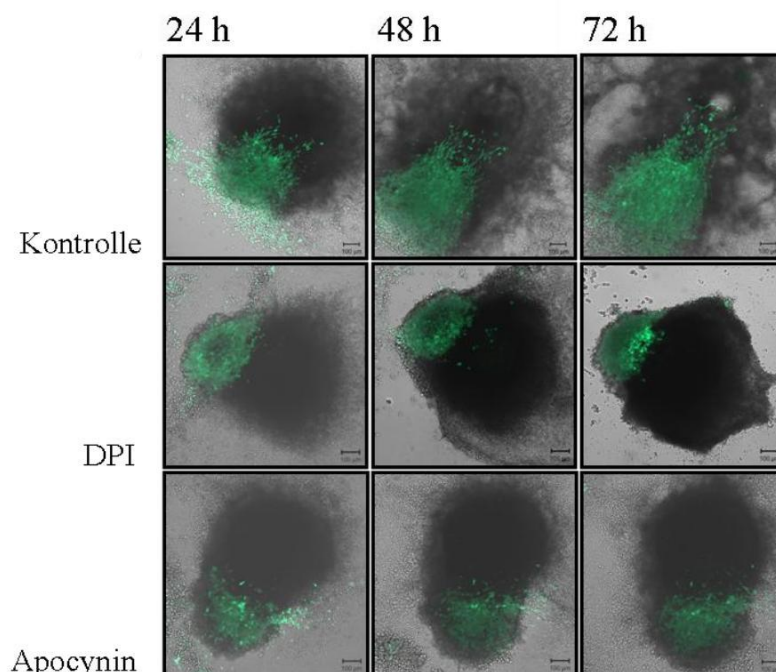


Abb. 8: Untersuchung des Migrationsverhaltens von 4T1 Sphäroiden (grün) in CGR8-EBs nach Behandlung mit den NADPH-Oxidaseinhibitoren DPI (10 μ M) und Apocynin (100 μ M).

Die Aufnahmen erfolgten mit dem cLSM bei einer Welllänge von 488 nm und im Transmissionsmodus. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten. Der Balken entspricht 100 μ m.

4.3 ROS-Generierung in CGR8-EBs während der Differenzierung

Für die Bestimmung der ROS-Produktion während der Differenzierung in den CGR8-EBs wurde der Fluoreszenzindikator H_2DCF -DA herangezogen. Die Messung der ROS begann am zweiten Tag der Differenzierung. Dieser Tag wurde auf 100 % gesetzt. Die Einstellungen für die Aufnahme der Fluoreszenzintensitäten mit dem cLSM wurden während dieser Phase beibehalten (*ceteris-paribus*-Klausel).

Die zeitabhängige Bestimmung der intrazellulären ROS in CGR8-EBs innerhalb von zehn Tagen (zweiten bis zwölften Tag) zeigte zu Beginn des Differenzierungsprozesses einen Anstieg der DCF-Fluoreszenz. Am dritten Tag war ein signifikanter Anstieg des Fluoreszenzsignals auf 136 ± 15 % und am vierten Tag auf 140 ± 34 % im Vergleich zum zweiten Tag (100 ± 26 %) zu verzeichnen. Ein Maximum wurde am sechsten Tag nach Starten der Differenzierung registriert. Das Fluoreszenzsignal stieg signifikant auf 157 ± 69 % im Vergleich zum zweiten Tag. Die intrazellulären ROS-Produktionen gemessen an den Tagen acht und zehn divergierten im Vergleich zum zweiten Tag kaum (Abb. 9).

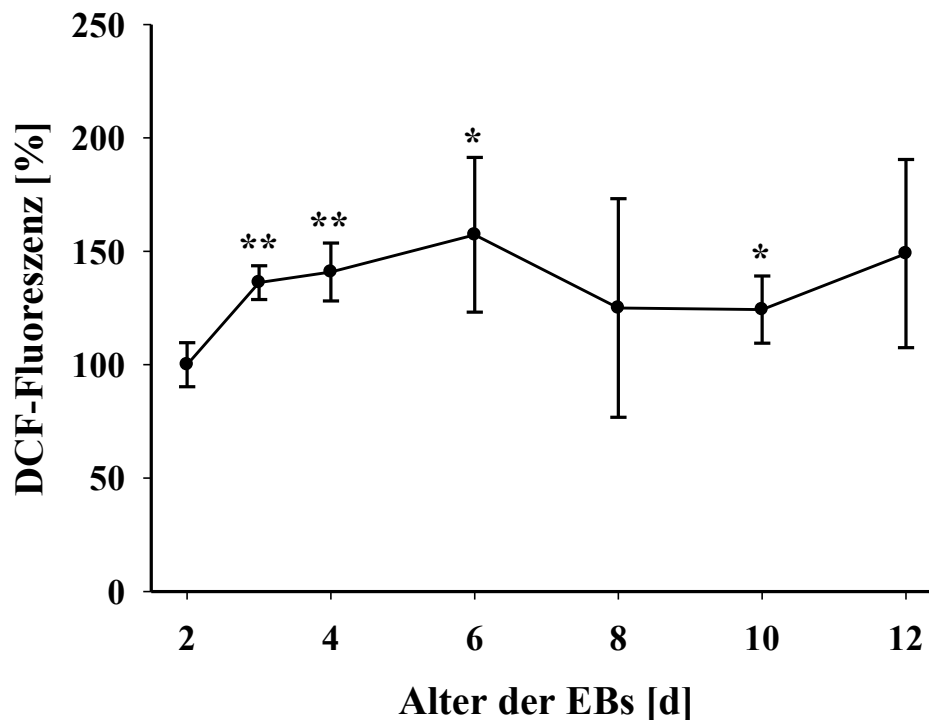


Abb. 9: Messung der intrazellulären ROS-Bildung in CGR8-EBs während eines Differenzierungszeitraumes von 12 Tagen.

Die Fluoreszenz des DCFs wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm mit dem cLSM gemessen. Dargestellt sind die MW \pm SD; n = 4; *p < 0,05, **p < 0,01 (Student's *t*-test)

4.4 Einfluss von LIF und inaktiven Fibroblasten auf die ROS-Generierung

Frühere Untersuchungen der ROS-Produktion an der murinen Stammzelllinie CCE zeigte bereits am zweiten Tag der Differenzierung eine starke Erhöhung der ROS-Generierung [Wartenberg, persönliche Mitteilung]. Diese Beobachtung widerspricht den Ergebnissen der ROS-Messung an CGR8-EBs (Abb. 9). Ein möglicher Grund für die divergierenden Ergebnisse könnte in den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen der beiden Zelllinien liegen. Für die Kultivierung der CCE-Zelllinie im undifferenzierten Zustand ist eine Matrixunterlage von inaktiven Fibroblasten notwendig, wohingegen die Kultivierung der CGR8-Zelllinie feederlayerfrei erfolgt.

Die undifferenzierten CGR8-Zellen wurden in hängende Tropfen zur Bildung von CGR8-EBs übergeführt. Es wurden folgende Inkubationsansätze verwendet:

- (I) Bildung von CGR8-EBs im normalen Differenzierungsmedium,
- (II) dem Medium wurde zusätzlich LIF hinzugegeben,
- (III) die Generierung der CGR8-EBs erfolgte mit inaktiven Fibroblasten (Fibro),
- (IV) im Medium befinden sich zusätzlich LIF und Fibroblasten.

Nach 48 h im hängenden Tropfen wurden die reaktiven Sauerstoffspezies mit DCF im cLSM gemessen. Die CGR8-EBs ohne LIF-Zugabe und ohne Fibroblasten wurden als Kontrolle (-LIF/-Fibro) genommen, indem die Intensität der Fluoreszenz auf 100 % gesetzt wurde. Die Fluoreszenzwerte der behandelten CGR8-EBs beziehen sich jeweils auf diesen Wert. Abb. 10 zeigt die graphische Darstellung der gemessenen Fluoreszenzen bezogen auf die Kontrolle (A) und repräsentative Bilder (B). Alle drei Ansätze (+LIF/-Fibro; -LIF/+Fibro und +LIF/+Fibro) zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies in zwei Tage alten CGR8-EBs.

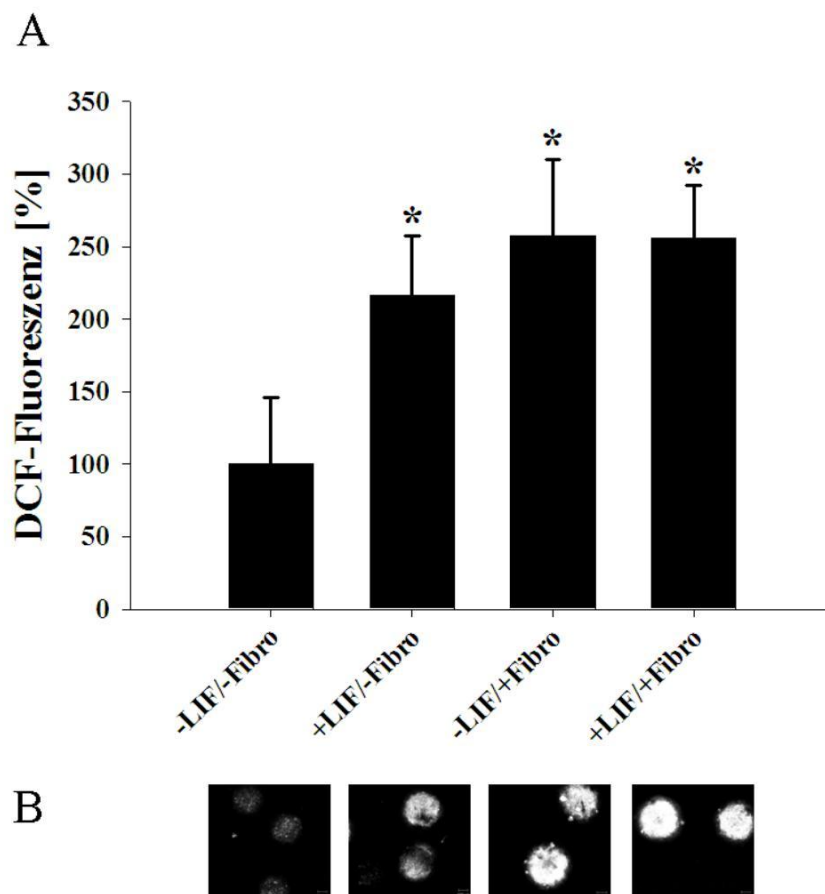


Abb. 10: Einfluss von LIF und Fibroblasten auf die ROS-Generierung.

Messung der ROS-Generierung an zwei Tage alten CGR8-EBs. (A) Graphische Darstellung der DCF-Fluoreszenz. Dargestellt sind die MW \pm SD, $n = 3$, $*p < 0,05$ (one-way ANOVA). (B) Repräsentative Bilder der Fluoreszenz, aufgenommen bei einer Wellenlänge von 488 nm.

(LIF = *Leukemia Inhibitory Factor*, Fibro = Fibroblasten)

Diese Daten lassen erkennen, dass sowohl das Cytokin LIF als auch die inaktiven Fibroblasten die Produktion von ROS in ES-Zellen beeinflussen oder selbst die Produzenten sind.

4.5 Etablierung stabiler shRNA-CGR8-Zelllinien

Zunächst galt es, ein geeignetes System für die Suppression der NADPH-Oxidase-untereinheiten NOX1, NOX2 und NOX4 zu finden. Eine effektive Methode für die Unterdrückung der Translation, über die Degradierung der mRNA, stellt das *gene silencing* dar. Die RNAi-Methode (RNA *interference*) bietet die Möglichkeit, die Expression von Genen zu unterdrücken und so die Funktion dieser zu untersuchen. Die sequenzspezifischen siRNAs (*small interfering RNAs*), welche den Zellen von außen appliziert werden, führen zu einer gezielten Degradation der korrespondierenden mRNA. Vermittler dieser Degradierung sind kurze, aus 21 - 23 Nukleotiden bestehende, Doppelstrang-RNA-Moleküle. Ein Nachteil der RNAi mit siRNA-Molekülen ist, dass die durch Transfektion von siRNAs provozierten „knockdown“-Effekte aufgrund des Abbaus der siRNA-Moleküle in den Zellen transient sind. Durch die Verwendung von *short hairpin* RNAs (shRNAs) kann eine stabile Suppression der Genexpression in kultivierten Säugerzellen durch eine kontinuierliche Expression erzielt werden, da die siRNAs durch die Zellen selber aus der vom geeigneten Expressionsvektor kodierten shRNA progressiert werden [Paddison et al., 2002].

4.5.1 Nachweis der Funktionalität der lentiviralen Transduktion

Zur Unterdrückung der Expression wurden in die murine CGR8-Zelllinie spezifische shRNA-Targets (Plasmide) für NOX1, NOX2 und NOX4 lentiviral stabil transduziert (Kap. 3.4.6). Neben der Transduktion von shRNA-NOX-spezifischen Plasmiden, wurde in eine unabhängige CGR8-Zelllinie eine Transduktion mit einem Vektor, der für ein grünfluoreszierendes Protein (GFP) kodiert. Diese Transduktion diente dazu, die Funktionalität des lentiviralen Transduktionssystems für die Zelllinie CGR8 zu testen.

Abb. 11 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines zehn Tage alten CGR8-EBs (**B**), das dazugehörige Transmissionsbild (**A**) sowie die Überlagerung beider Aufnahmen (**C**). Die lentiviral transduzierten CGR8-ES-Zellen wurden für zehn Tage unter Selektionsdruck durch Puromycin kultiviert. Nach Beendigung der Selektion wurden die CGR8-ES-Zellen in der Spinnerkultur zur Differenzierung gebracht und nach vier Tagen ausplattiert. Am zehnten Tag der Kultivierung erfolgte die mikroskopische Aufnahme im Transmissions- und Fluoreszenzmodus.

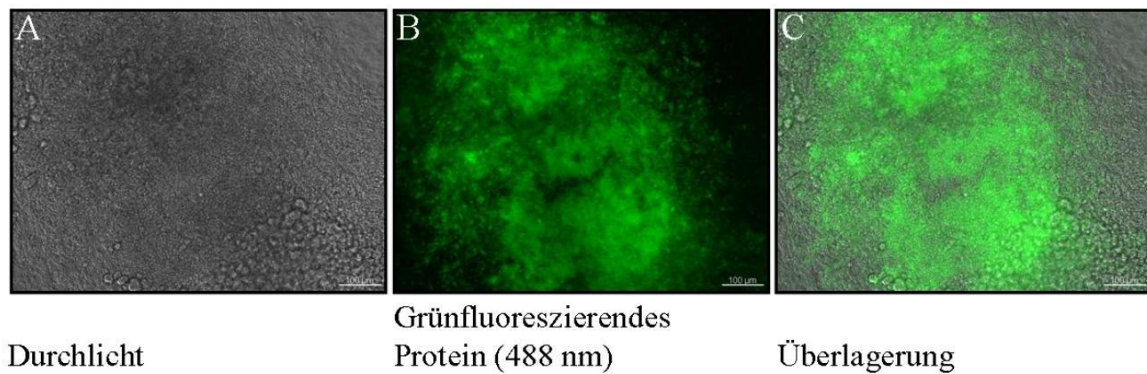


Abb. 11: Nachweis der methodischen Funktionalität der lentiviralen Transduktion von CGR8-Zellen durch Einbringen eines GFP-kodierenden Vektors.

Abgebildet ist ein zehn Tage alter GFP-transduzierter CGR8-EB im Transmissionsmodus (**A**), im Fluoreszenzmodus mit einer Wellenlänge von 488 nm (**B**) und einer Überlagerung der beiden Modi (**C**). Balken entspricht 100 µm.

4.5.2 Nachweis der Unterdrückung der NOX1, NOX2 und NOX4 durch shRNA

Im Folgenden sollte die Unterdrückung der NOX-Expression bzw. der Synthese in den shRNA-NOX1-, shRNA-NOX2- und shRNA-NOX4-transduzierten CGR8-Zellen im Vergleich zur Kontrolle nachvollzogen werden. Es wurden drei shRNA-Targets pro Isoform getestet (Kap. 2.10). In den nachfolgenden Abschnitten sind die Ergebnisse der Targets dargelegt.

shRNA-NOX1

Eine deutliche Herabregulierung der NOX1-Expression zeigte sich durch das pLKO.1-Derivat shRNA-NOX1-2 (Kap. 2.10) - im Nachfolgenden als shRNA-NOX1 bezeichnet. Abb. 12 A stellt das Expressionsniveau von *NOX1* in den transduzierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen am sechsten und am achten Tag ihrer Differenzierung dar. Sowohl am sechsten Tag (elffach) als auch am achten Tag (dreifach) war eine signifikante Herabregulierung der *NOX1*-Expression im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Prozentual wurde eine Herabregulierung zwischen 70 % und 90 % erreicht. Eine Unterdrückung der NOX1 durch die eingesetzte shRNA auf Proteinebene war ebenfalls gegeben (Abb. 12 B). Sie beträgt 50 % im Vergleich zur Kontrolle (100 %).

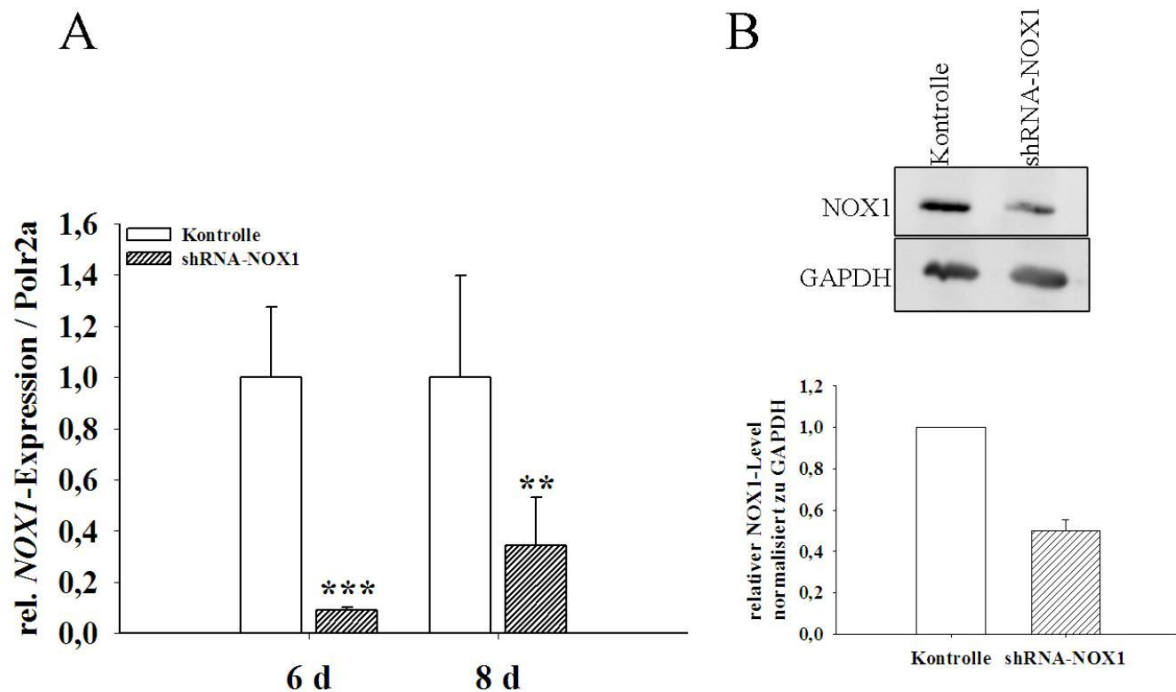


Abb. 12: Suppression der katalytischen Untereinheit NOX1 mittels shRNA.

(A) Relatives Expressionsniveau von *NOX1* in shRNA-NOX1-transduzierten CGR8-Zellen am sechsten und achten Tag der Differenzierung im Vergleich zu den Kontroll-CGR8-Zellen. Die Daten wurden mittels Real-Time PCR erhoben und auf die Expression von *Polr2a* normalisiert. Dargestellt sind die MW \pm SD aus $n = 3$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Student's *t*-test). (B) Detektion von NOX1 im Western Blot in normalen und shRNA-NOX1-transduzierten CGR8-EBs jeweils am zehnten Tag. Repräsentativer Blot und die graphische Darstellung aus $n = 3$; MW \pm SD.

shRNA-NOX2

Die Unterdrückung der katalytischen Untereinheit NOX2, vermittelt durch die shRNA-NOX2-5 (im Nachfolgenden als shRNA-NOX2 bezeichnet), liegt im Fehlerbereich, wie Abb. 13 darstellt. Damit wurde keine signifikante Herabregulierung der *NOX2*-Expression im Vergleich zur Kontrolle erreicht. Am sechsten Tag war eine 1,8-fache Herabregulierung zu verzeichnen, was einer Suppression von 46 % entspricht. Eine deutlich geringere Herabregulierung von 25 % zeigte sich am achten Tag. Gleichermäßen wurde am zehnten Tag die Effizienz der shRNA untersucht, und eine Herabregulierung von 33 % im Vergleich zur Kontrolle beobachtet (Abb. 13 A). Bei genauer Betrachtung von Abb. 13 B war auch auf Proteinebene keine deutliche Unterdrückung des NOX2-Proteines durch die eingesetzte shRNA zu verzeichnen (shRNA-NOX2 = 86 % vs. Kontrolle = 100 %), was die erhaltenen Daten auf Transkriptionsebene bestätigt.

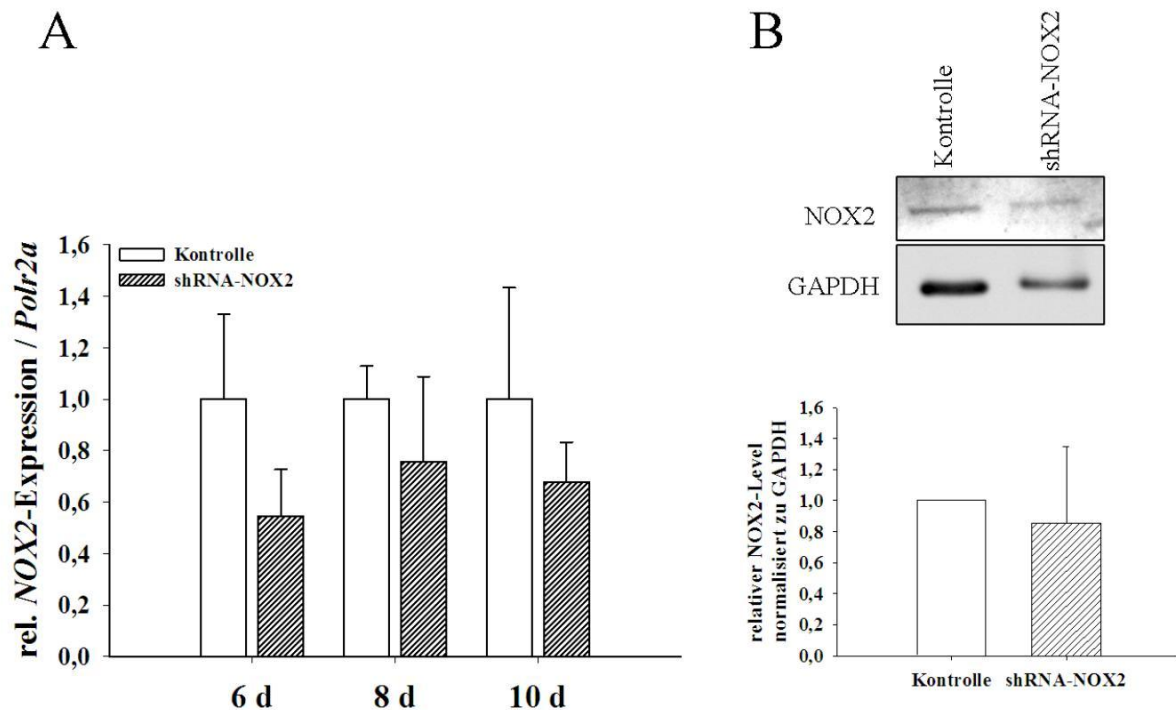


Abb. 13: Suppression der katalytischen Untereinheit NOX2 mittels shRNA.

(A) Relatives Expressionsniveau von NOX2 in shRNA-NOX2-transduzierten CGR8-Zellen am sechsten Tag, achten und zehnten Tag der Differenzierung im Vergleich zu den Kontroll-CGR8-Zellen. Die Daten wurden mittels Real-Time PCR erhoben und auf die Expression von *Polr2a* normalisiert. Dargestellt sind die MW \pm SD aus $n = 3$. (B) Detektion von NOX2 im Western Blot in normalen und shRNA-NOX2-transduzierten CGR8-EBs jeweils am zehnten Tag. Repräsentativer Blot und die graphische Darstellung aus $n = 3$; MW \pm SD.

shRNA-NOX4

Den deutlichsten Effekt auf die Expression der NOX4 wurde mit dem pLKO.1-Derivat shRNA-NOX4-4 (in Nachfolgenden als shRNA-NOX4 bezeichnet) erzielt. Abb. 14 zeigt die Untersuchung der Wirksamkeit der shRNA am sechsten, achten und zehnten Tag in den sich differenzierenden CGR8-EBs im Vergleich zur Kontrolle. Am sechsten Tag war im Vergleich zur Kontrolle kein signifikanter Unterschied erkennbar. Es wurde eine Unterdrückung von 14 % erreicht. Am achten und zehnten Tag war die *NOX4*-Expression im Vergleich zur Kontrolle signifikant geringer. Am achten Tag konnte eine 43 %ige Herabregulierung nachgewiesen werden, und am zehnten Tag wurde eine Suppression von 60 % gegenüber der Kontrolle erreicht (Abb. 14 A). Die Betrachtung der Suppression auf der Proteinebene zeigte eine Herabregulierung auf 50 % im Vergleich zur Kontrolle (100 %) (Abb. 14 B).

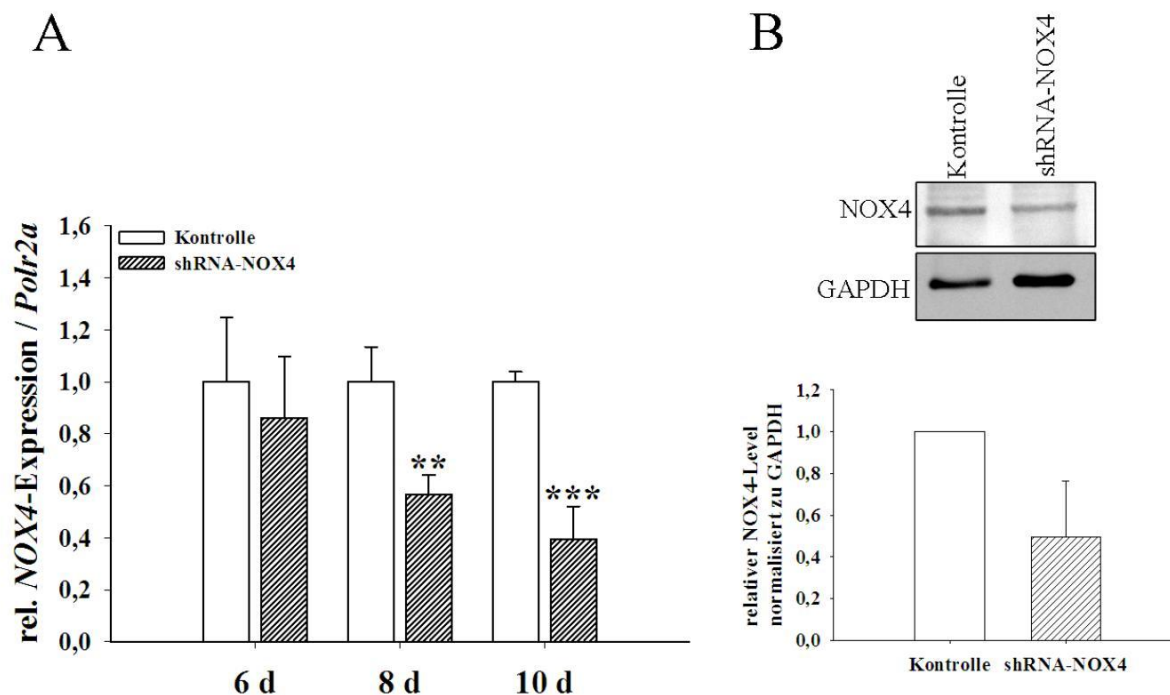


Abb. 14: Suppression der katalytischen Untereinheit NOX4 mittels shRNA.

(A) Relatives Expressionsniveau von *NOX4* in shRNA-NOX4-transduzierten CGR8-Zellen am sechsten, achten und zehnten Tag der Differenzierung im Vergleich zu den Kontroll-CGR8-Zellen. Die Daten wurden mittels Real-Time PCR erhoben und auf die Expression von *Polr2a* normalisiert. Dargestellt sind die MW \pm SD aus $n = 3$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Student's *t*-test). (B) Detektion von NOX4 im Western Blot in normalen und shRNA-NOX4-transduzierten CGR8-EBs jeweils am zehnten Tag. Repräsentativer Blot und die graphische Darstellung aus $n = 3$; MW \pm SD.

Die Quantifizierung des Proteingehalts erfolgte durch die Auswertung der Bandenintensität mit der Auswertungssoftware MultiGauge V3.0 (Fujifilm). Die ermittelten Werte wurden gegen das Standardprotein GAPDH normalisiert.

4.5.3 Kreuzreaktion der spezifischen shRNAs mit den anderen NOX-Isoformen

Einfluss der shRNA-NOX1 auf die Expression von NOX2 und NOX4

Die verwendete shRNA-NOX1 hat weder auf die Expression von NOX2 (Abb. 15 A) noch auf die von NOX4 (Abb. 15 B) einen Einfluss. Sowohl am sechsten als auch am achten Tag ist das Expressionsniveau von *NOX2* und *NOX4* im Vergleich zur Kontrolle gleich.

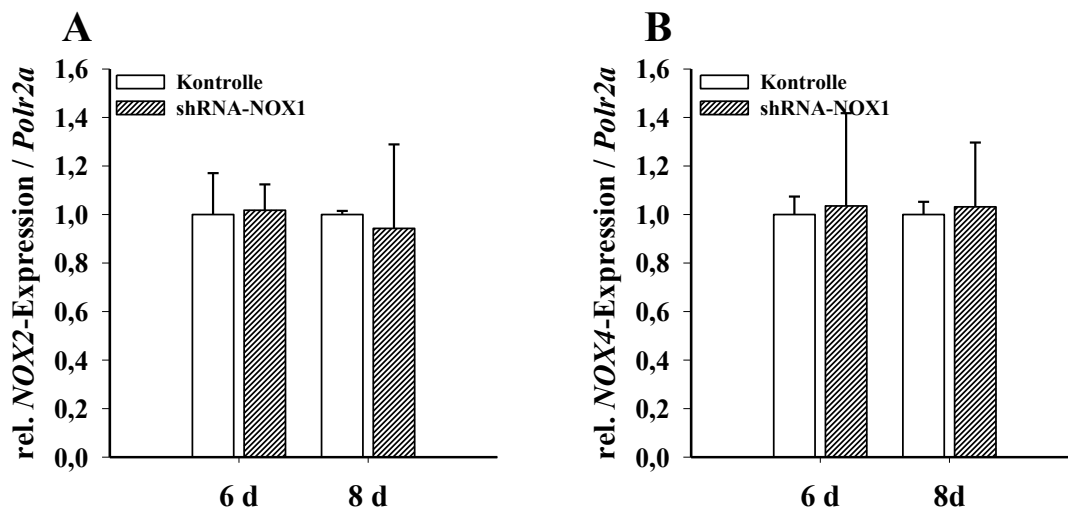


Abb. 15: Kreuzreaktionen der shRNA-NOX1.

Detektion des *NOX2*- (A) und *NOX4*-Expressionsniveau (B) in shRNA-NOX1-transduzierten CGR8-EBs am sechsten und achten Tag der Differenzierung. Die Daten wurden mittels Real-Time PCR erhoben und auf die Expression von *Polr2a* normalisiert. Dargestellt sind die MW \pm SD aus n = 3.

Einfluss der shRNA-NOX4 auf die Expression von NOX1 und NOX2

Auch bei der Untersuchung möglicher Einwirkungen der shRNA-NOX4 auf die Expression von *NOX1* und *NOX2* wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den transduzierten Zellen und den Kontrollzellen gefunden (Abb. 16 A und B).

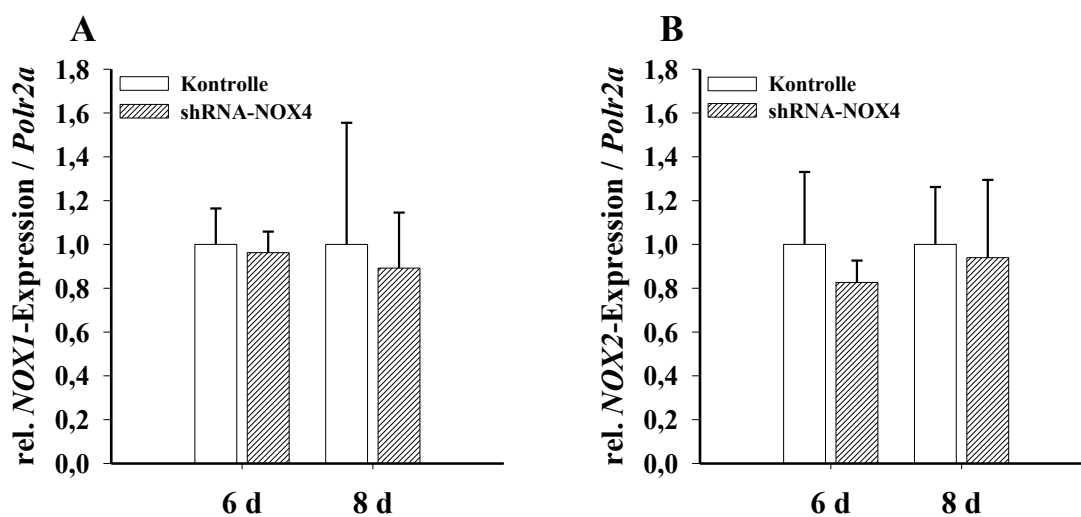


Abb. 16: Kreuzreaktionen der shRNA-NOX4.

Detektion des *NOX1*- (A) und *NOX2*-Expressionsniveau (B) in shRNA-NOX4-transduzierten CGR8-EBs am sechsten und achten Tag der Differenzierung. Die Daten wurden mittels Real-Time PCR erhoben und auf die Expression von *Polr2a* normalisiert. Dargestellt sind die MW \pm SD aus n = 3.

Einfluss der shRNA-NOX2 auf die Expression von NOX1 und NOX4

Bei der Untersuchung des Einflusses der shRNA-NOX2 auf die Expression von *NOX1* und *NOX4* war kein nennenswerter Unterschied der NOX1-Expression in den shRNA-NOX2-transduzierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen festzustellen (Abb. 17A). Allerdings wurde ein negativer Effekt auf die Expression der *NOX4* im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen (Abb. 17 B).

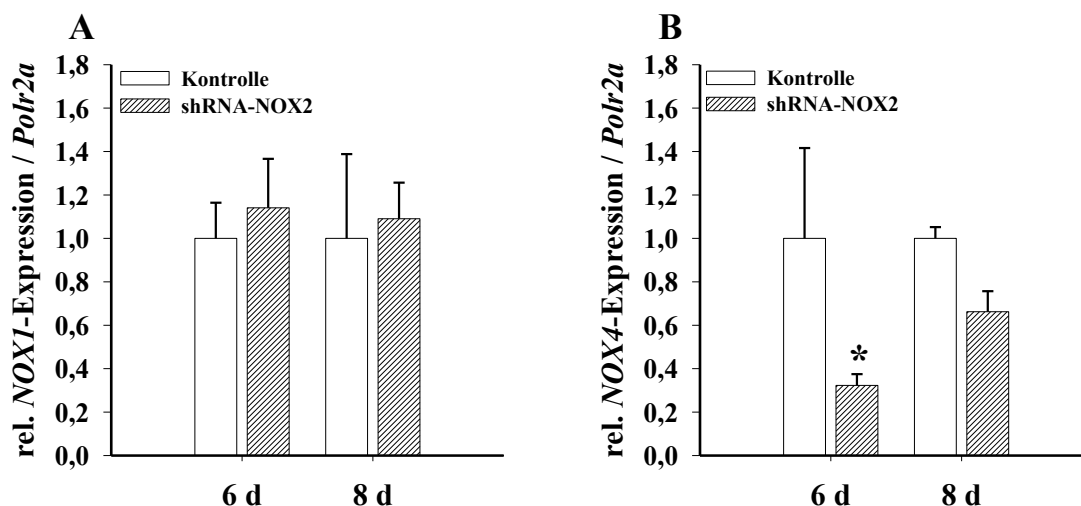


Abb. 17: Kreuzreaktionen der shRNA-NOX2.

Detektion des *NOX1*- (A) und *NOX4*-Expressionsniveau (B) in shRNA-NOX2-transduzierten CGR8-EBs am sechsten und achten Tag der Differenzierung. Die Daten wurden mittels Real-Time PCR erhoben und auf die Expression von *Polr2a* normalisiert. Dargestellt sind die MW \pm SD aus $n = 3$, * $p < 0,05$ (Student's *t*-test).

4.6 NADPH-Oxidasen in der Differenzierung CGR8-ES-Zellen

4.6.1 Pharmakologische Untersuchungen

4.6.1.1 Messung der ROS mittels DCF

Die CGR8-EBs wurden mit den NADPH-Oxidaseinhibitoren DPI (10 μ M) und Apocynin (100 μ M) für einen Zeitraum von einer Stunde bei einer Temperatur von 37 $^{\circ}$ C inkubiert. Die Behandlung der Zellen mit 20 μ M H₂DCF-DA erfolgte über einen Zeitraum von 20 min. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Die Messung der DCF-Fluoreszenz erfolgte mit dem cLSM.

Den deutlichsten Effekt der NADPH-Oxidaseinhibitoren DPI und Apocynin auf die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies zeigte sich am zweiten Tag der Differenzierung (Abb. 18). Die Fluoreszenzintensität des DCF war in den DPI-behandelten Proben um 44 % und in den Apocynin-behandelten Proben um 36 % signifikant geringer als in den Kontrollproben (100 \pm 13 %).

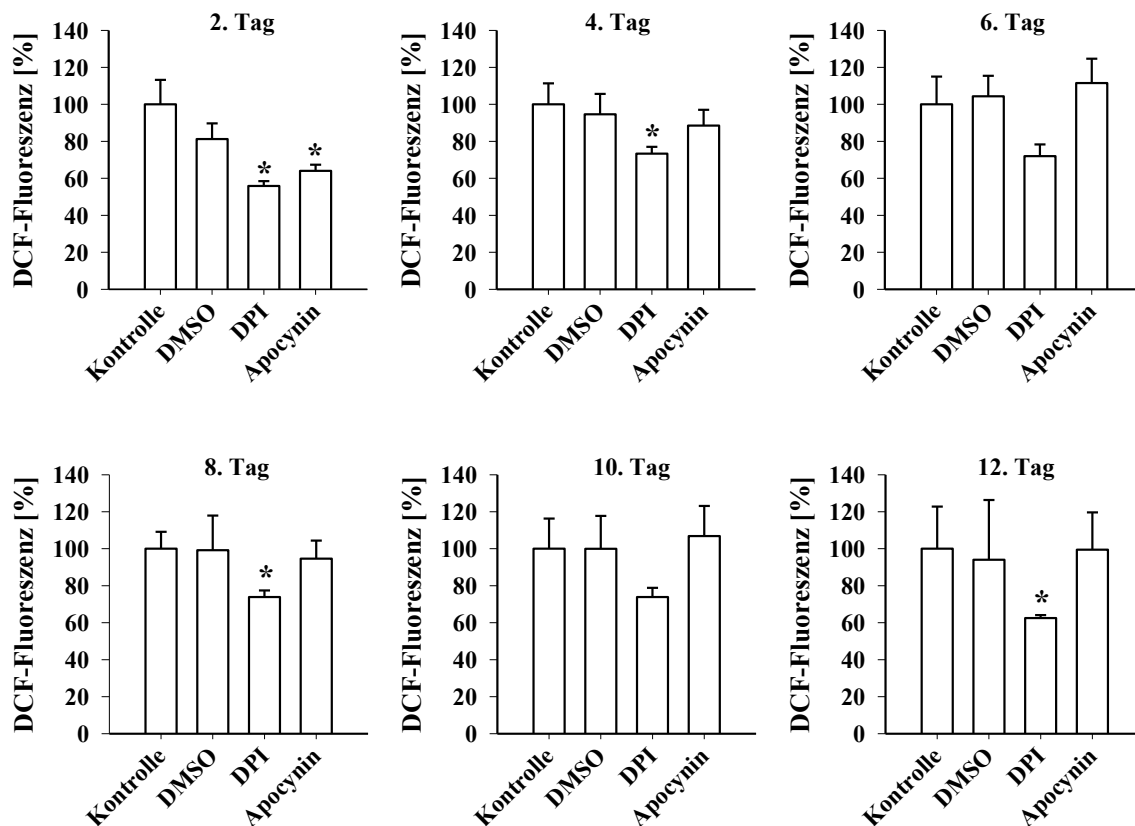


Abb. 18: Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die intrazelluläre ROS-Generierung.

Detektion der intrazellulären ROS an CGR8-EBs nach Behandlung mit den NADPH-Oxidaseinhibitoren DPI (10 μ M) und Apocynin (100 μ M). Dargestellt sind die MW \pm SD, n = 4, *p < 0,05 (Student's *t*-test).

An den weiteren Messtagen hatte allein nur der NADPH-Oxidaseinhibitor DPI einen Einfluss auf die ROS-Generierung, wohingegen die Behandlung mit Apocynin keine wesentliche Veränderung des ROS-Levels in den CGR8-EBs aufwies (Abb. 18, Tab. 11).

Tab. 11: Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die Generierung der ROS.

Behandlung	Fluoreszenzintensität [%]					
	2. Tag	4. Tag	6. Tag	8. Tag	10. Tag	12. Tag
Kontrolle	100 \pm 13	100 \pm 11	100 \pm 15	100 \pm 9	100 \pm 16	100 \pm 23
DMSO	81 \pm 8	95 \pm 11	104 \pm 11	99 \pm 19	100 \pm 18	94 \pm 32
DPI	56 \pm 3	73 \pm 4	72 \pm 6	74 \pm 4	74 \pm 5	62 \pm 2
Apocynin	64 \pm 3	89 \pm 9	112 \pm 13	95 \pm 10	107 \pm 16	99 \pm 20

4.6.1.2 Messung der ROS mittels DHE

Mit dem redoxsensitiven Farbstoff Dihydroethidium (DHE) ist es möglich die Generierung von Superoxidanionen in Zellen selektiv zu messen [Kobzik et al., 1990, Peshavariya et al., 2007].

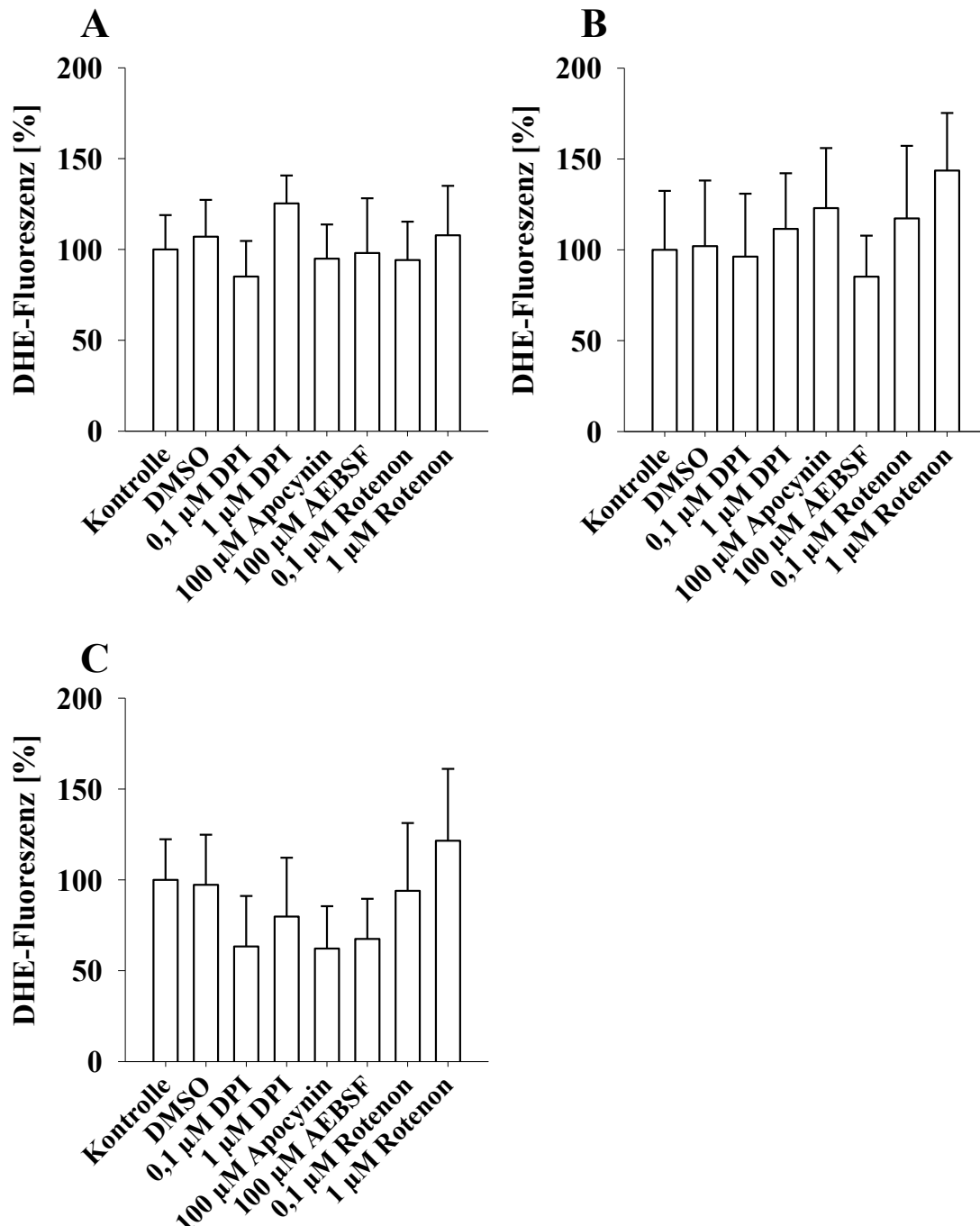


Abb. 19: Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die Superoxidanionengenerierung.

Detektion der Generierung von Superoxidanion in CGR8-EBs am zweiten (A), dritten (B) und vierten Tag (C) der Differenzierung nach Behandlung mit DPI, Apocynin, AEBSF und Rotenon. Dargestellt sind MW \pm SD. n = 3

Die CGR8-EBs wurden mit den NADPH-Oxidaseinhibitoren DPI (0,1 μ M und 1 μ M), Apocynin (100 μ M) und AEBSF (100 μ M) sowie mit dem Hemmer der mitochondrialen Atmungskette Rotenon (0,1 μ M und 1 μ M) über einen Zeitraum von einer Stunde bei einer Temperatur von 37 °C behandelt. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit 20 μ M DHE-Lösung für 20 min. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm mit dem cLSM detektiert.

Die Behandlung der CGR8-EBs mit 0,1 μ M DPI am zweiten Tag ihrer Differenzierung zeigte lediglich eine Absenkung der DHE-Fluoreszenzintensität auf 85 ± 19 % im Vergleich zur Kontrolle (100 ± 19 %). Bei einer Konzentration von 1 μ M DPI war sogar eine Erhöhung der Intensität auf 125 ± 15 % zu verzeichnen. Die Behandlung der CGR8-EBs mit den Substanzen Apocynin, AEBSF und Rotenon ergab ebenfalls keine Änderung der gemessenen Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 19 A). Die Messung am dritten Tag ergab ebenfalls keine Änderungen der Fluoreszenzintensitäten bezogen auf die Kontrolle. Andeutungsweise war ein kleiner Effekt von AEBSF auf die Generierung von Superoxidanion in den CGR8-EBs zu beobachten. So ist hier die Fluoreszenzintensität des DHE auf 85 ± 22 % in Vergleich zur Kontrolle reduziert (Abb. 19 B). Die Inkubation der CGR8-EBs mit 1 μ M Rotenon zeigte indes eine Erhöhung der DHE-Intensität auf 143 ± 31 % im Vergleich zur Kontrolle. Den deutlichsten Effekt der NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die Generierung von Superoxidanion zeigte sich am vierten Tag der Differenzierung (Abb. 19 C). Die Behandlung mit DPI bewirkte eine Verringerung der DHE-Intensität auf 63 ± 28 % (0,1 μ M) und 80 ± 32 % (1 μ M). Ebenso wurde die Superoxidaniongenerierung in den CGR8-EBs auf 62 ± 23 % nach Apocyninapplikation und auf 67 ± 22 % nach AEBSF-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (100 ± 22 %) verringert. Eine verminderte Produktion an Superoxidanion in den rotenonbehandelten CGR8-EBs konnte nicht festgestellt werden.

4.6.1.3 NADPH-Oxidasen und Angiogenese

Expression des Endothelmarkers PECAM-1 in CGR8-EBs

Die hier verwendete embryonale Stammzelllinie ist in der Lage in Endothelzellen zu differenzieren. Der Endothelmarker PECAM-1 ist ein Adhäsionsmolekül, welches vorwiegend auf der Oberfläche von Endothelzellen vorkommt. Somit kann dieser Marker eingesetzt werden, um den Differenzierungsprozess der Angiogenese im *In-Vitro*-Modell CGR8-EBs zu untersuchen.

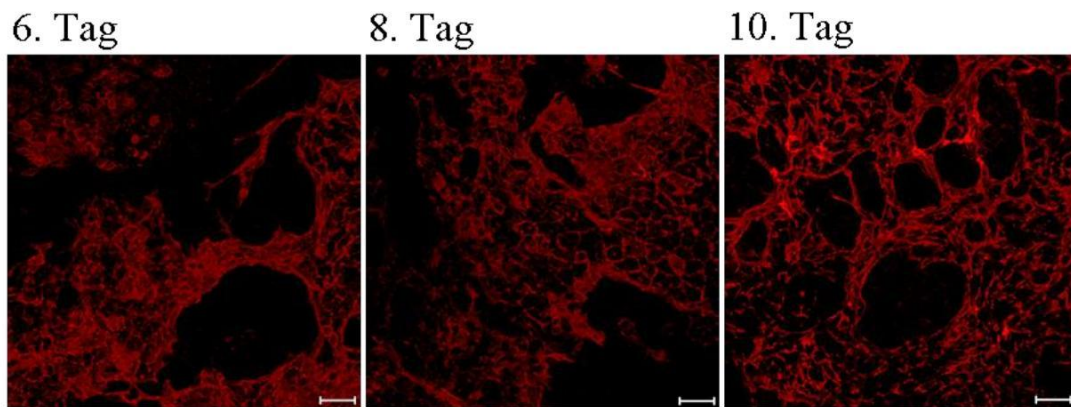


Abb. 20: Charakterisierung der Gefäßentwicklung in CGR8-EBs.

Nachweis des Endothelmarkers PECAM-1 in Methanol/Aceton-fixierten CGR8-EBs am sechsten, achten und zehnten Tag. Dargestellt sind repräsentativer Bilder aus drei unabhängigen Experimenten. Der Balken entspricht 50 μm .

Abb. 20 zeigt eine PECAM-1-Färbung an sechs, acht und zehn Tage alten CGR8-EBs. Es ist deutlich die Ausbildung von kapillarähnlichen Strukturen zu erkennen, deren Ausprägung im zeitlichen Verlauf der Differenzierung zunimmt.

Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP2 und MMP9 in CGR8-EBs

Für das Sprouten und die Migration von Endothelzellen während der Angiogenese spielen die Matrixmetalloproteinasen der extrazellulären Matrix eine Rolle.

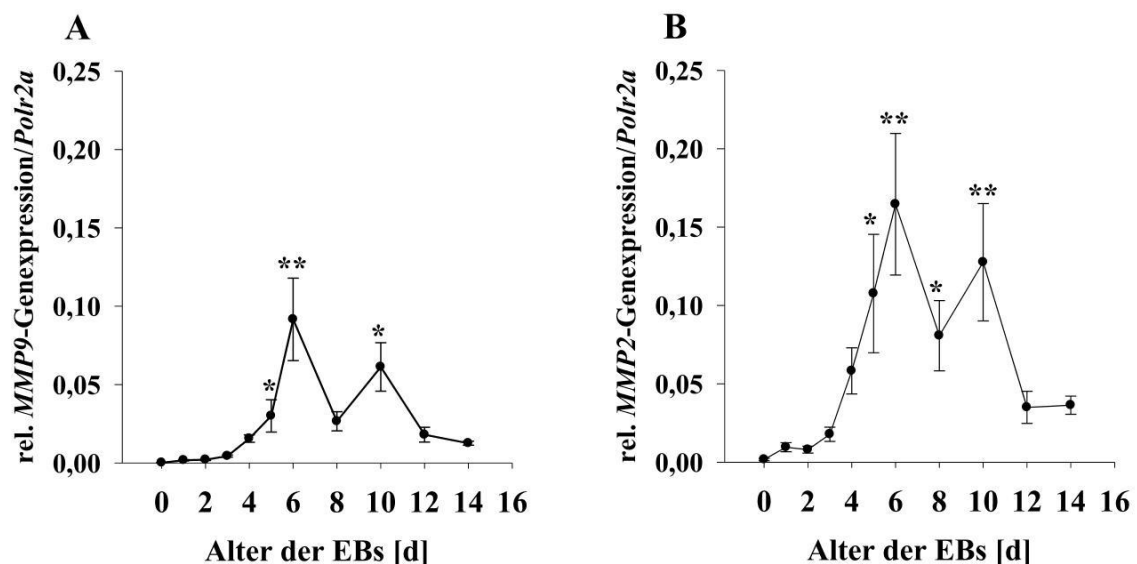


Abb. 21: Charakterisierung der Matrixmetalloproteinasen MMP9 und MMP2 in CGR8-EBs während eines Differenzierungszeitraumes von 14 Tagen.

Relatives mRNA-Expressionsniveau der Matrixmetalloproteinasen *MMP9* (A) und *MMP2* (B) in CGR8-EBs. Die Daten wurden mittels Real-Time PCR erhoben und auf die Expression von *Polr2a* normalisiert. Dargestellt sind MW \pm SD. n = 3 - 5. *p < 0,05, **p < 0,01 (one-way ANOVA).

Die Erfassung des Transkriptionslevels von *MMP9* und *MMP2* in CGR8-EBs innerhalb von 14 Tagen ergab sowohl für *MMP9* als auch für *MMP2* ein signifikantes Maximum am sechsten Tag der Differenzierung (Abb. 21 **A** und **B**). Im Vergleich zeigten beide Untersuchungen **A** und **B** ein ähnliches Expressionsmuster, wobei jeweils zunächst ein langsamer Anstieg über drei Tage zu erkennen war. Vom vierten Tag an wurde dieser Anstieg steiler, bis er schließlich am sechsten Tag ein globales Maximum erreichte. Am achten Tag erfolgte ein Abfall der Expression von *MMP9* und *MMP2*. Am zehnten Tag war wiederum eine Zunahme der Expression in den Zellen festzustellen, welche an den darauf folgenden Tagen wieder abnahm.

NOX-Inhibitoren und die Expression von PECAM-1 und VE-Cadherin

Für den möglichen Einfluss der NADPH-Oxidasen auf die Angiogenese in den CGR8-EBs, wurden die Endothelmarker PECAM-1 und VE-Cadherin hinsichtlich ihrer Expression nach der Behandlung mit den Inhibitoren DPI (1 µM), Apocynin (100 µM) und AEBSF (100 µM) untersucht. Die Applikation der Substanzen erfolgte am dritten Tag der Differenzierung.

PECAM-1

Nach einem Behandlungszeitraum von 24 h war die Expression von *PECAM-1* in den mit Apocynin und AEBSF behandelten CGR8-EBs signifikant geringer als in den Kontrollzellen (Abb. 22 **A**). In den mit Apocynin behandelten Zellen war das Expressionsniveau um 2,5-fach und in den mit AEBSF behandelten um 2,3-fach signifikant geringer als in den unbehandelten Zellen. In den mit DPI behandelten CGR8-EBs konnte *PECAM-1* mittels Real-Time PCR am vierten Tag nicht nachgewiesen werden. Am sechsten Tag der Differenzierung war tendenziell eine geringere *PECAM-1*-Expression sowohl in den DPI-, Apocynin- als auch in den AEBSF-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen (Abb. 22 **B**). Der dritte dargestellte Graph (Abb. 22 **C**) zeigt die Änderung des Expressionsniveaus von *PECAM-1* in den Kontrollzellen am vierten und sechsten Tag. Es war ein signifikanter (8,8-facher) Anstieg an *PECAM-1*-mRNA am sechsten Tag im Vergleich zum vierten Tag zu beobachten.

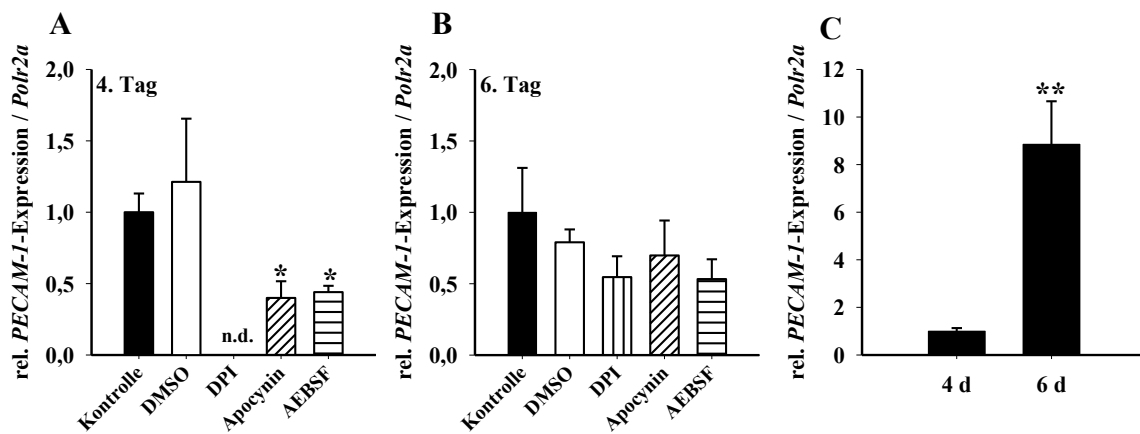


Abb. 22: Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die Expression des Endothelmarkers *PECAM-1*.

Relatives Expressionniveau von *PECAM-1* am vierten (A) und sechsten Tag (B) in den CGR8-EBs nach Behandlung mit den NADPH-Oxidaseinhibitoren DPI, Apocynin und AESBF. (C) Relatives Expressionsniveau von *PECAM-1* in den Kontroll-CGR8-EBs bezogen auf beide Tage. Die Daten wurden mittels Real-Time PCR erhoben und auf *Polr2a* normalisiert. Dargestellt sind die MW \pm SD. n = 3, *p < 0,05, **p < 0,01 (Student's t-test).

Neben der Genexpressionanalyse von *PECAM-1* in den behandelten CGR8-EBs wurde auch die Proteinebene mit Hilfe der Western Blot-Methode untersucht. Am sechsten, achten und zehnten Tag wurden aus den Inkubationsansätzen die Gesamtproteinmenge isoliert, elektrophoretisch in der SDS-PAGE separiert und auf eine Membran transferiert. Der immunologische Nachweis von PECAM-1 erfolgte mit dem spezifischen Antikörper der Firma Abcam (Kap. 2.7).

In Abb. 23 sind sowohl repräsentative Blots (A) als auch die densitometrische Auswertung (B) der PECAM-1-Synthese in CGR8-EBs, die zuvor dem Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren DPI, Apocynin und AESBF ausgesetzt waren, dargestellt. Am sechsten Tag war im Vergleich zur Kontrolle (100 %) kein über den methodischen Fehler hinaus gehender Gehalt an PECAM-1 in den DPI- (108 %), Apocynin- (115 %) und AESBF-behandelten (109 %) festzustellen. Auch am achten Tag war kein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten und den unbehandelten Proben nachweisbar: Kontrolle = 100 % vs. DPI = 99 %; Apocynin = 130 %; AESBF = 107 %. Lediglich am zehnten Tag zeigte sich eine Verringerung der PECAM-1-Synthese unter Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren um ca. 20 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 23).

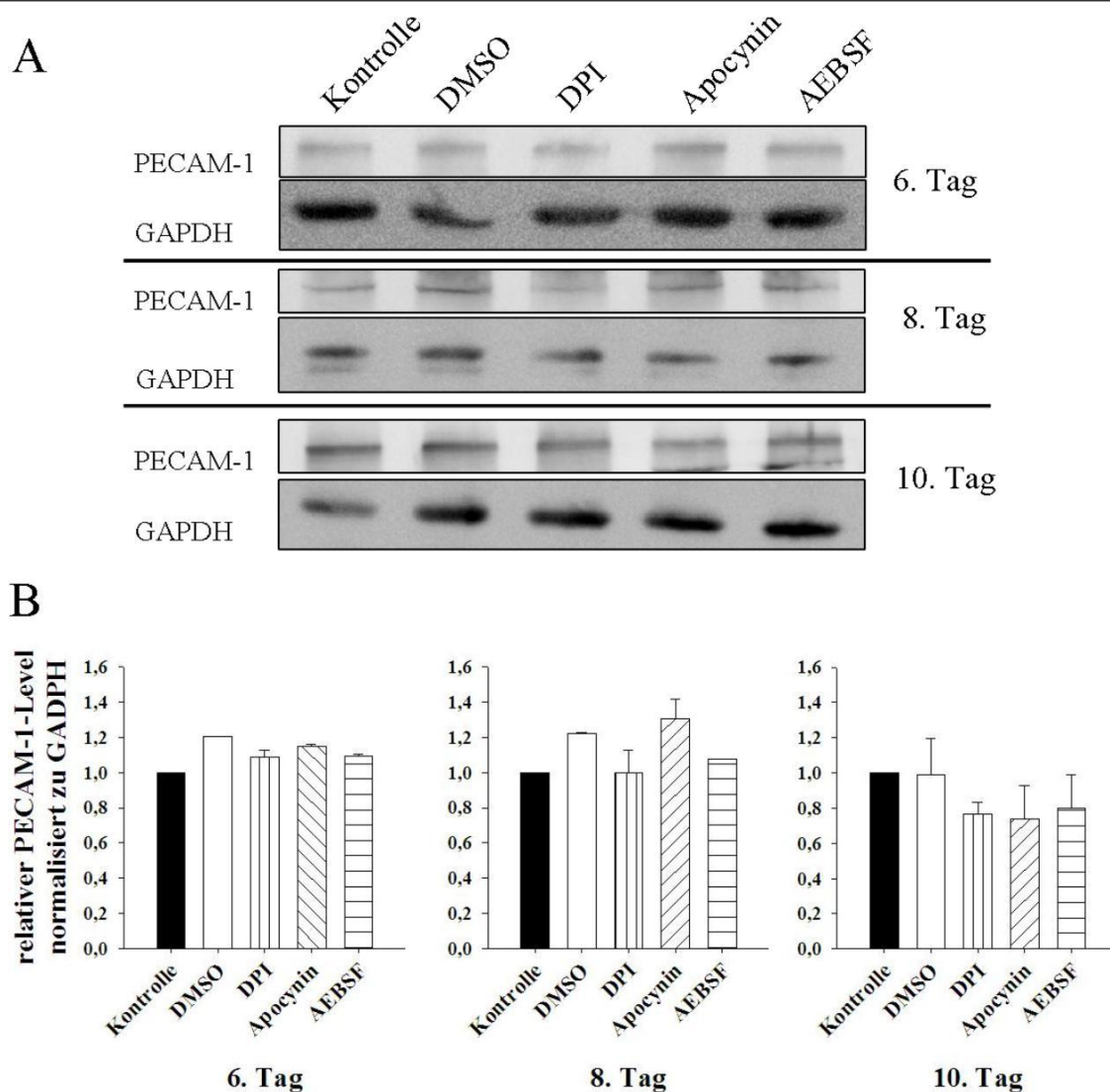


Abb. 23: Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die Synthese von PECAM-1.

Dargestellt ist der Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren DPI, Apocynin und AEBSF auf die Synthese von PECAM-1 an sechs, acht und zehn Tage alten CGR8-EBs. **(A)** Repräsentative Blots aus drei unabhängigen Versuchen. **(B)** Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung für PECAM-1. Dargestellt sind $MW \pm SD$, $n = 3$. Als Ladekontrolle wurde das Protein GAPDH nachgewiesen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass an den untersuchten Tagen kein signifikanter Einfluss der eingesetzten NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die Proteinexpression von PECAM-1 in den CGR8-EBs besteht.

Die Quantifizierung des Proteingehalts erfolgte durch die Auswertung der Bandenintensität mit Hilfe der Auswertungssoftware MultiGauge V3.0 (Fujifilm). Zur Standardisierung der aufgetragenen Proteinmengen wurde GAPDH verwendet.

VE-Cadherin

Neben der Bestimmung des Endothelmarkers PECAM-1 wurde zusätzlich die Expression von *VE-Cadherin* untersucht. Nach einer Behandlung von 24 h zeigt sich ein signifikanter Einfluss der Inhibitoren DPI und Apocynin auf die *VE-Cadherin*-Expression im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 24 A). In den AEBSF-behandelten CGR8-EBs war tendenziell ebenfalls eine geringe *VE-Cadherin*-Expression zu verzeichnen.

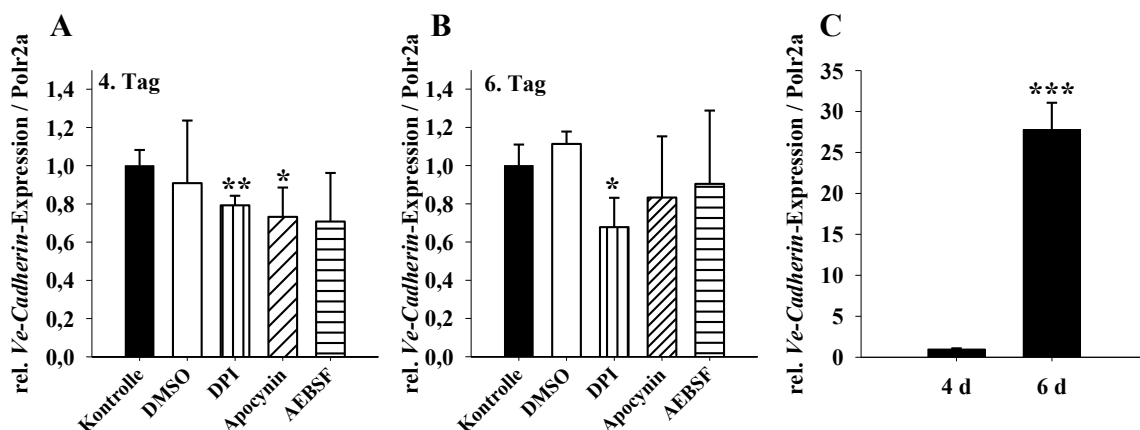


Abb. 24: Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die Expression des Endothelmarkers *VE-Cadherin*.

Relatives Expressionsniveau von *VE-Cadherin* am vierten (A) und sechsten Tag (B) nach Behandlung mit den NADPH-Oxidaseinhibitoren DPI, Apocynin und AEBSF. (C) Relatives Expressionsniveau von *VE-Cadherin* in den Kontroll-CGR8-EBs bezogen auf beide Tage. Die Daten wurden mittels Real-Time PCR und *Polr2a* normalisiert. Dargestellt sind die MW \pm SD, n = 3, *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 (Student's *t*-test).

Am sechsten Tag war die *VE-Cadherin*-Expression in den DPI-behandelten CGR8-EBs weiterhin signifikant geringer als in den Kontroll-CGR8-EBs (Abb. 24 B), wohingegen die Inhibitoren Apocynin und AEBSF nur noch tendenziell einen Einfluss auf die Expression in den CGR8-EBs ausübten. In Abb. 24 C ist ergänzend der Expressionslevel von *VE-Cadherin* am vierten Tag im Vergleich zum sechsten Tag dargestellt.

NOX-Inhibitoren und die Expression von MMP9

In Kap. 4.6.1.3 wurde die zeitabhängige Expression der Matrixmetallproteinasen MMP9 und MMP2 während eines Differenzierungszeitraumes von 14 Tagen dargestellt. Es wurde eine maximale Expression beider MMPs am sechsten Tag beobachtet (Abb. 21).

Nach einem Behandlungszeitraum von 24 h mit den NADPH-Oxidaseinhibitoren, war in den Apocynin- und AEBSF-behandelten CGR8-EBs die Expression von *MMP9* um das 2-fache (p < 0,05) und 1,6-fache (p < 0,05) geringer als in den Kontroll-CGR8-EBs

(Abb. 25 A). Das Expressionsniveau von *MMP9* in DPI-behandelten CGR8-EBs unterscheidet sich indessen nicht von dem Expressionsniveau in den unbehandelten CGR8-EBs.

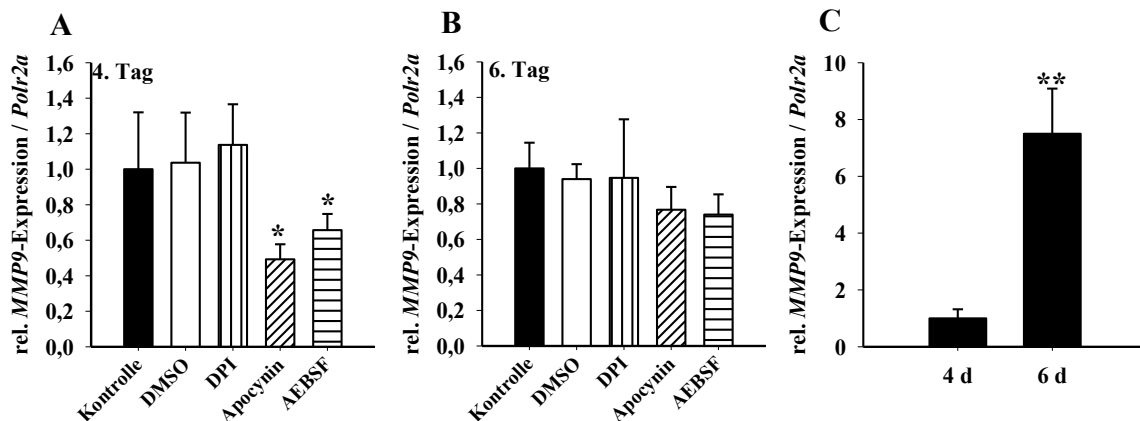


Abb. 25: Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die Expression von *MMP9*.

Relatives Expressionniveau von *MMP9* am vierten (A) und sechsten Tag (B) in den CGR8-EBs nach Behandlung mit den NADPH-Oxidaseinhibitoren DPI, Apocynin und AEBSF. (C) Relatives Expressionniveau von *MMP9* in den Kontroll-CGR8-EBs bezogen auf beide Tage. Die Daten wurden mittels Real-Time PCR erhoben und auf *Polr2a* normalisiert. Dargestellt sind die MW \pm SD, n = 3, *p < 0,05; **p < 0,01 (Student's *t*-test).

Am sechsten Tag war das Expressionsniveau von *MMP9* in den DPI-behandelten CGR8-EBs ebenfalls auf dem gleichen Level wie in den Kontroll-CGR8-EBs. In den Apocynin- und AEBSF-behandelten Zellen hingegen war eine geringere Expression von *MMP9* zu verzeichnen (Abb. 25 B).

4.6.1.4 NADPH-Oxidasen und die kardiale Differenzierung

Einfluss der NOX-Inhibitoren auf die Kontraktibilität der CGR8-EBs

Am zehnten Tag der Differenzierung unter dem Einfluss der Inhibitoren DPI (0,1 μ M), Apocynin (100 μ M) und AEBSF (100 μ M) erfolgte die Auszählung der kontrahierenden Areale (Abb. 26). Die Behandlung der CGR8-EBs mit dem Inhibitor DPI zeigt einen signifikanten Effekt auf die Anzahl der spontan kontrahierenden Areale. Im Vergleich zur Kontrolle war hier eine Minderung dieser Areale um 20 % zu verzeichnen. Der NADPH-Oxidaseinhibitor Apocynin, der die Zusammenlagerung des Multienzymkomplexes verhindert, zeigte keinen Effekt auf die Kontraktionsfähigkeit der CGR8-EBs. Die dritte NADPH-Oxidaseinhibitor AEBSF [Diatchuk et al., 1997, Wartenberg et al., 2005] zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Erhöhung der kontrahierenden Areale um 32%.

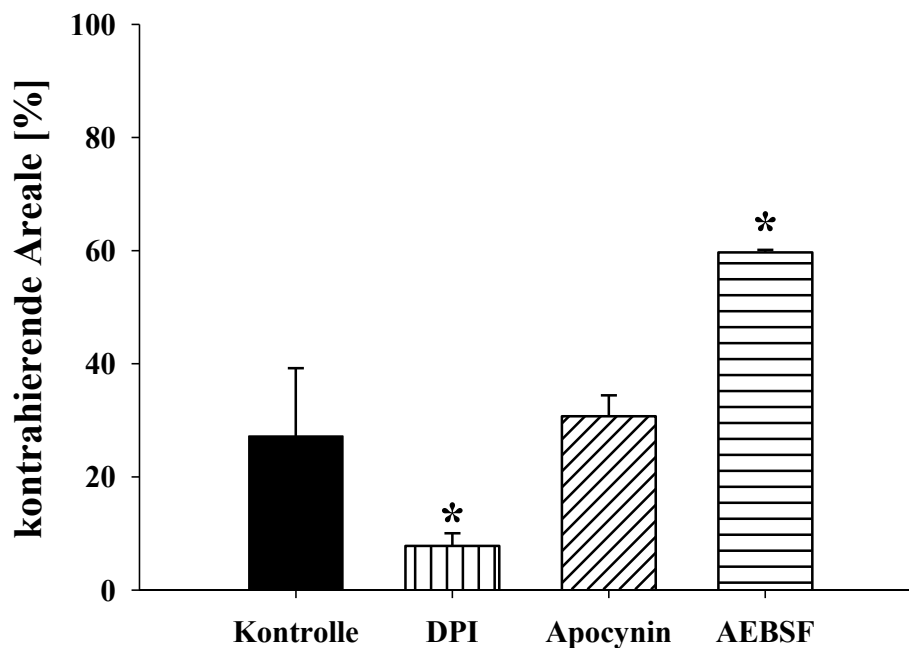


Abb. 26: Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die Ausbildung kontrahierender Areale.

Auszählung der kontrahierende Areale in zehn Tage alten CGR8-EBs nach Behandlung mit den NADPH-Oxidaseinhibitoren DPI, Apocynin und AEBSF, wobei $n = 3$, $*p < 0,05$ (one-way ANOVA).

NOX-Inhibitoren und die Expression kardialer Marker

Abb. 27 zeigt die Expression von *MLC2v* (*Myosin Light Chain 2v*) nach Behandlung mit NADPH-Oxidaseinhibitoren am vierten (A) und sechsten Tag (B) und zum anderen den Expressionsunterschied von *MLC2v* zwischen diesen beiden Tagen (C). Am vierten Tag der Differenzierung und nach einem Behandlungszeitraum von 24 h mit DPI und Apocynin war kein Unterschied in der Expression von *MLC2v* zu verzeichnen (Abb. 27 A). Einzig in den AEBSF-behandelten CGR8-EBs war ein signifikant erhöhter Level an *MLC2v* im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Am sechsten Tag hingegen war in den behandelten CGR8-EBs eine Reduktion des *MLC2v*-Levels auf $0,55 \pm 0,11$ (DPI) und $0,69 \pm 0,26$ (Apocynin) im Vergleich zur Kontrolle ($1 \pm 0,19$) sichtbar (Abb. 27 B). Die Applikation der CGR8-EBs mit $100 \mu\text{M}$ AEBSF zeigte entgegen den Literaturaussagen eine signifikante Zunahme von *MLC2v* ($1,85 \pm 0,34$) im Vergleich zu den unbehandelten CGR8-EBs ($1 \pm 0,19$).

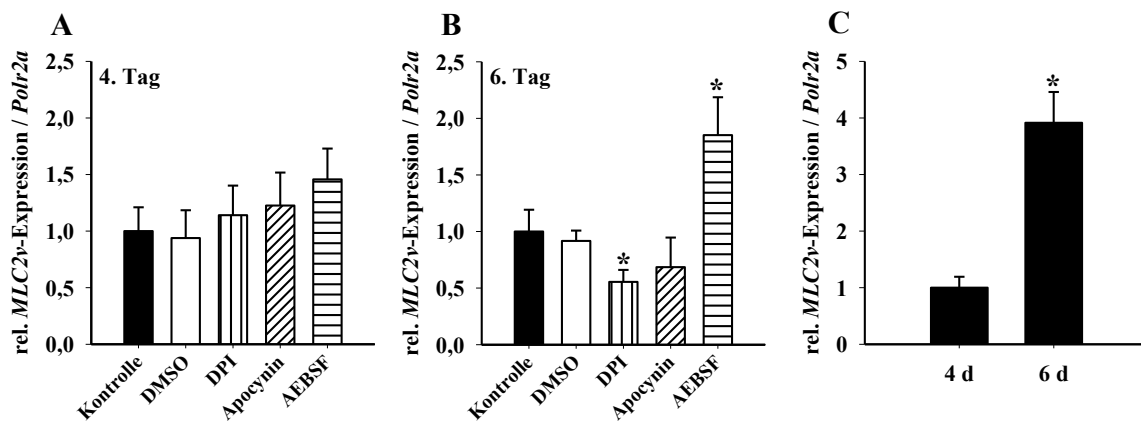


Abb. 27: Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren auf die Expression des kardialen Markers *MLC2v*.

Relatives Expressionniveau von *MLC2v* am vierten (A) und sechsten Tag (B) in den CGR8-EBs nach Behandlung mit den NADPH-Oxidaseinhibitoren DPI, Apocynin und AEBSF. Relatives Expressionsniveau von *MLC2v* in den Kontroll-CGR8-EBs bezogen auf beide Tage (C). Die Daten wurden mittels Real-Time PCR erhoben und auf *Polr2a* normalisiert. Dargestellt sind die MW \pm SD, n = 3, *p < 0,05 (Student's *t*-test).

Die Untersuchung der Expression des kontraktiven Proteins beta-MHC (*Myosin Heavy Chain*) nach Behandlung mit den NADPH-Oxidaseinhibitoren erfolgte mittels Western Blot-Analyse. Hierfür wurden von den Proben die Gesamtproteinmengen genommen, elektrophoretisch in der SDS-PAGE separiert und auf eine Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen das beta-MHC (Kap. 2.7).

Abb. 28 zeigt einen repräsentativen Immunblot. Dabei wurde der stärkste Einfluss auf die Expression des beta-MHC-Proteins mit der Substanz DPI erzielt. Im Vergleich zur Kontrolle (100 %) war das Auftreten von beta-MHC in den DPI-behandelten CGR8-EBs auf 22 % reduziert. Die CGR8-EBs, die mit Apocynin behandelt wurden, zeigten eine Verringerung der Expression von beta-MHC auf 50 % im Vergleich zur Kontrolle (100 %). Den geringsten Effekt auf das beta-MHC-Protein zeigte die Substanz AEBSF, die den Gehalt an beta-MHC auf 64 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert.

Die Quantifizierung des Proteingehalts erfolgte durch die Auswertung der Bandenintensität mit Hilfe der Auswertungssoftware MultiGauge V3.0 (Fujifilm). Zur Standardisierung der aufgetragenen Proteinmengen wurde GAPDH verwendet.

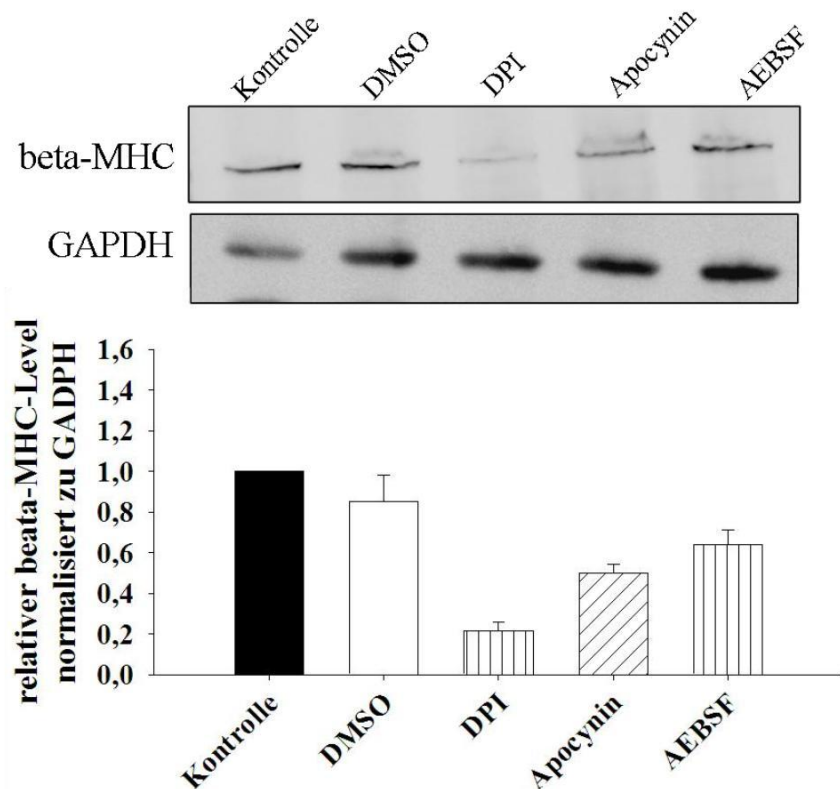


Abb. 28: Einfluss der NADPH-Oxidasen auf die Synthese von beta-MHC.

Dargestellt ist der Einfluss der NADPH-Oxidaseinhibitoren DPI, Apocynin und AEBSF auf die Synthese von beta-MHC in acht Tage alten CGR8-EBs. Graphische Darstellung aus $n = 3$; $MW \pm SD$. Repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen. Als Ladekontrolle wurde GAPDH nachgewiesen.

4.6.2 shRNA-Studien

4.6.2.1 Messung der ROS mittels DCF

Die Messung der intrazellulären ROS in den shRNA-transduzierten CGR8-EBs und der Kontrolle erfolgte am vierten, sechsten und achten Tag nach Beginn der Differenzierung. In Abb. 29 sind die ermittelten Werte der ROS-Generierung in den shRNA-transduzierten CGR8-EBs im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Tendenziell war am vierten und sechsten Tag die Fluoreszenzintensität des DCFs in allen shRNA-transduzierten CGR8-EBs geringer als in den Kontroll-CGR8-EBs (Abb. 29 A und B). So betrug am vierten Tag der Differenzierung der Gehalt an gemessenen ROS in den shRNA-NOX1-CGR8-EBs $81 \pm 29 \%$, in den shRNA-NOX2-CGR8-EBs $70 \pm 16 \%$ und in den shRNA-NOX4-CGR8-EBs $85 \pm 19 \%$ im Vergleich zur Kontrolle ($100 \pm 26 \%$) (Abb. 29 A). Zwischen den einzelnen shRNA-transduzierten CGR8-EBs war hingegen sowohl am vierten als auch am sechsten Tag kein Unterschied in der Generierung von ROS zu verzeichnen.

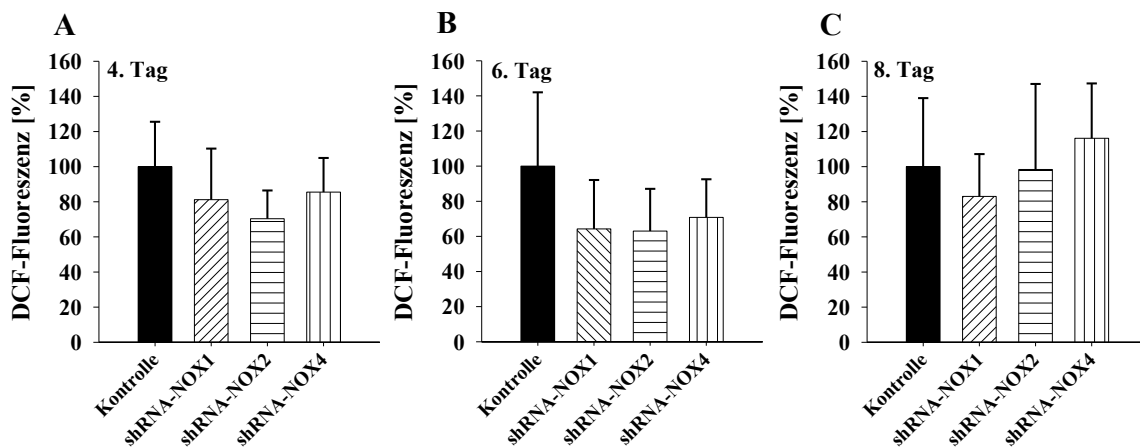


Abb. 29: Einfluss der shRNAs NOX1, NOX2 und NOX4 auf die intrazelluläre ROS-Generierung.

Detektion der intrazellulären ROS in shRNA-transduzierten CGR8-EBs am vierten (A), sechsten (B) und achten Tag (C) der Differenzierung. Die Messung der Fluoreszenz von DCF erfolgte mit dem cLSM bei einer Wellenlänge von 488 nm. Dargestellt sind MW \pm SD aus n = 3 – 5.

Am sechsten Differenzierungstag war tendenziell der ROS-Level in den shRNA-transduzierten CGR8-EBs zwischen 30 % und 37 % niedriger als in den Kontroll-CGR8-EBs (Abb. 29 B). Am achten Tag der Differenzierung war die ROS-Generierung in den shRNA-transduzierten und in den Kontroll-CGR8-EBs vergleichbar (Abb. 29 C).

4.6.2.2 Messung der ROS mittels DHE

Die Messung der Superoxidanionengenerierung erfolgte am vierten, sechsten und achten Tag, wie schon bei der intrazellulären ROS-Messung (Kap. 4.6.2.1).

Die DHE-Messung in den shRNA-transduzierten CGR8-EBs zeigte, wie auch schon die Messung der intrazellulären ROS, eine geringere $O_2^{\bullet-}$ -Produktion am vierten und sechsten Tag (Abb. 30 A und B). So war zum Beispiel am sechsten Tag der Wert der DHE-Fluoreszenz in den shRNA-NOX1-CGR8-EBs auf 46 ± 22 %, in den shRNA-NOX2-CGR8-EBs auf 63 ± 17 % ($p < 0,057$) und in den shRNA-NOX4-CGR8-EBs auf 56 ± 23 % ($p < 0,062$) gesunken (Abb. 30 B). Am achten Tag war kein Unterschied zwischen den shRNA-transduzierten und den Kontroll-CGR8-EBs zu beobachten (Abb. 30 C).

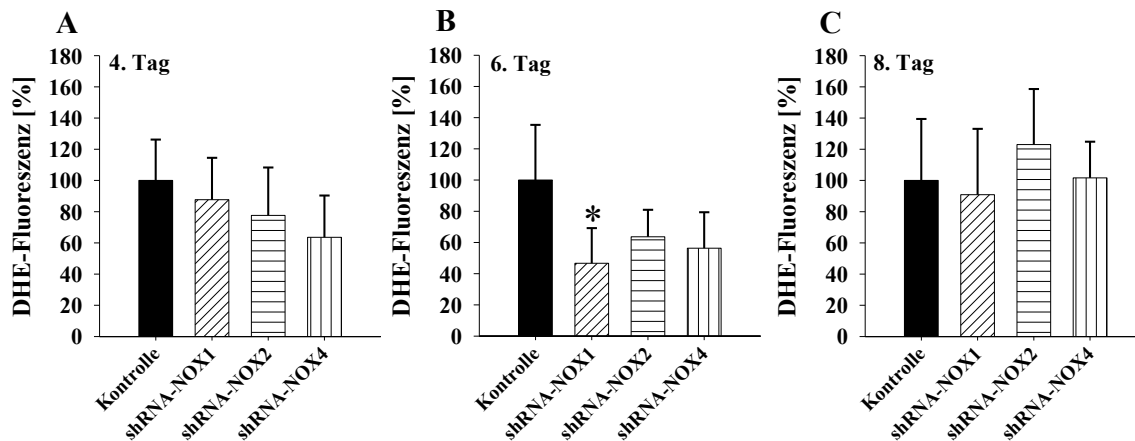


Abb. 30: Einfluss der shRNAs NOX1, NOX2 und NOX4 auf die Superoxidaniongenerierung.

Detektion der Generierung von Superoxidanion in shRNA-transduzierten CGR8-EBs am vierten (A), sechsten (B) und achten Tag (C) der Differenzierung. Die Messung der Fluoreszenz von DHE erfolgte mit dem cLSM bei einer Wellenlänge von 488 nm. Dargestellt sind MW \pm SD aus $n = 3 - 5$. * $p < 0,05$ (Student's *t*-test).

4.6.2.3 Einfluss der NOX1-, NOX2- und NOX4-Unterdrückung auf die Angiogenese

Ein Differenzierungsprozess, der im Zuge der Unterdrückung der NADPH-Oxidasen durch RNA-Interferenz untersucht wurde, war die Angiogenese. Zunächst erfolgte die Detektion des transkribierten Genes *PECAM-1* mittels Real-Time PCR am vierten, sechsten und achten Tag der Differenzierung in den shRNA-transduzierten Zellen im Vergleich zur Expression in den unbehandelten Zellen.

In den shRNA-NOX1-transduzierten CGR8-EBs war sowohl am vierten ($0,66 \pm 0,06$; $p < 0,05$) als auch am sechsten Tag ($0,45 \pm 1,10$; $p < 0,01$) eine signifikante Herabregulierung der Expression zu verzeichnen (Abb. 31). Am achten Tag hingegen war mengenmäßig die Expression von *PECAM-1* in den veränderten Zellen ($0,90 \pm 0,22$) der Expression dieses Gens in den Kontrollzellen ($1 \pm 0,28$) annähernd gleich.

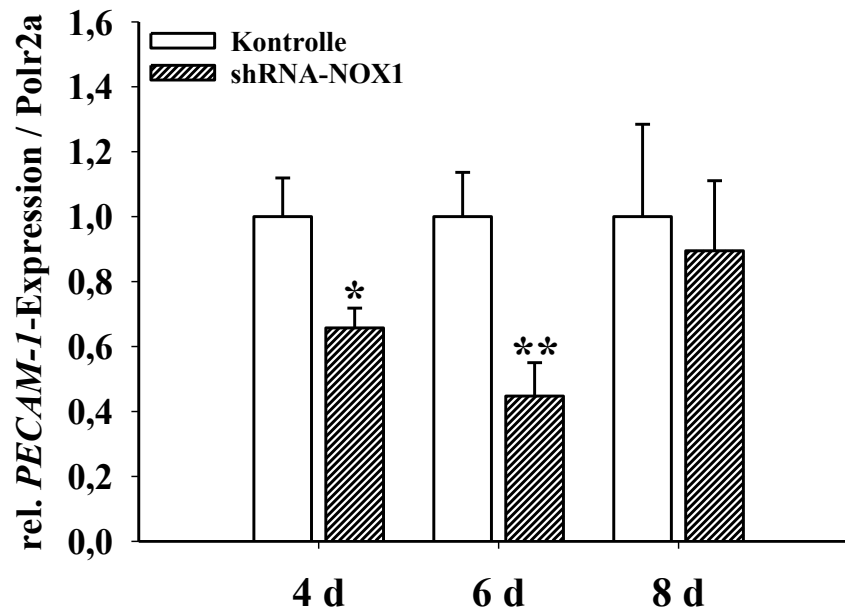


Abb. 31: Einfluss der shRNA-NOX1 auf die Expression des Endothelmarkers *PECAM-1*.

Relatives *PECAM-1*-Expressionsniveau in shRNA-NOX1-transduzierten CGR8-EBs am vierten, sechsten und achten Tag der Differenzierung im Vergleich zu Kontroll-CGR8-EBs. Die Daten wurden mittels Real-Time PCR erhoben und auf *Polr2a* normalisiert. Dargestellt sind MW \pm SD aus $n = 3$, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Student's *t*-test).

In Abb. 32 ist das Aufkommen von *PECAM-1* in Zellen dargestellt, in denen eine Unterdrückung der NOX2-Expression erreicht werden sollte. Am vierten Tag der Differenzierung dieser Zellen war die Expression von *PECAM-1* signifikant auf $0,10 \pm 0,04$ ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle ($1 \pm 0,06$) verringert. An den anderen Messtagen war ebenfalls eine geringere Menge am *PECAM-1*-Transkript (6. Tag: $0,44 \pm 0,03$; 8. Tag: $0,63 \pm 0,06$) zu verzeichnen. Die Differenz der *PECAM-1*-Expression zwischen den Kontrollzellen und den shRNA-NOX2-transduzierten Zellen nahm im Laufe der Differenzierungszeit ab.

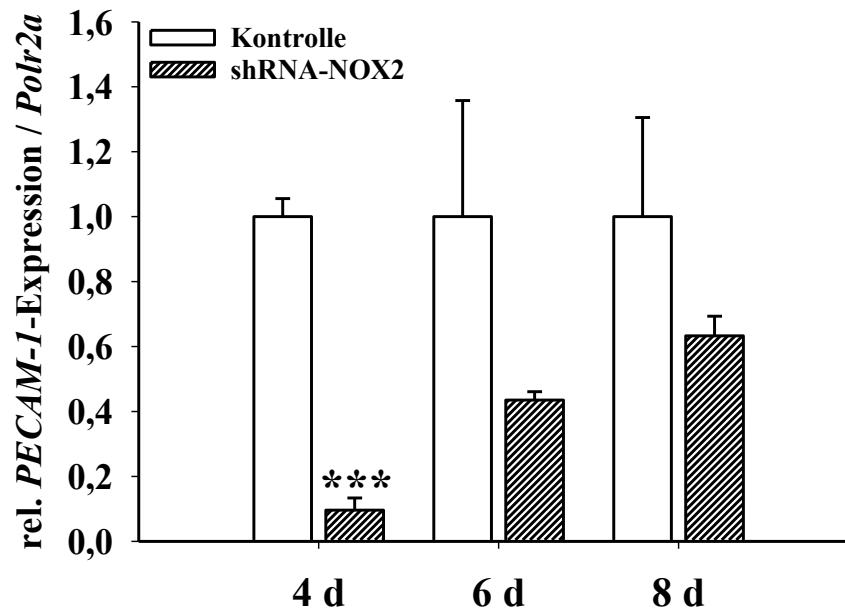


Abb. 32: Einfluss der shRNA-NOX2 auf die Expression des Endothelmarkers *PECAM-1*.

Relatives *PECAM-1*-Expressionsniveau in shRNA-NOX2-transduzierten CGR8-EBs am vierten, sechsten und achten Tag der Differenzierung im Vergleich zu Kontroll-CGR8-EBs. Die Daten wurden mittels Real-Time PCR erhoben und auf *Polr2a* normalisiert. Dargestellt sind MW \pm SD aus $n = 3$, *** $p < 0,001$ (Student's t -test).

Die letzte NADPH-Oxidase, die durch das Einbringen einer spezifischen shRNA unterdrückt wurde, ist die Isoform NOX4. In diesen Zellen wurde ebenfalls das Auftreten von *PECAM-1* auf der Transkriptionsebene am vierten, sechsten und achten Tag der Differenzierung betrachtet. Am vierten Tag war deutlich eine Verringerung der Expression von *PECAM-1* auf $0,12 \pm 0,03$ ($p < 0,001$) in den shRNA-transduzierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle ($1 \pm 0,06$) zu sehen (Abb. 33). Am sechsten Tag hingegen war die *PECAM-1*-Expression in der Kontrolle ($1 \pm 0,24$) und in den shRNA-NOX4-transduzierten Zellen ($0,85 \pm 0,156$) annähernd gleich. Zwei Tage später war die Expression von *PECAM-1* in den shRNA-NOX4-transduzierten CGR8-EBs ($1,05 \pm 0,16$) auf dem gleichen Niveau wie die Expression in den Kontrollzellen ($1 \pm 0,39$).

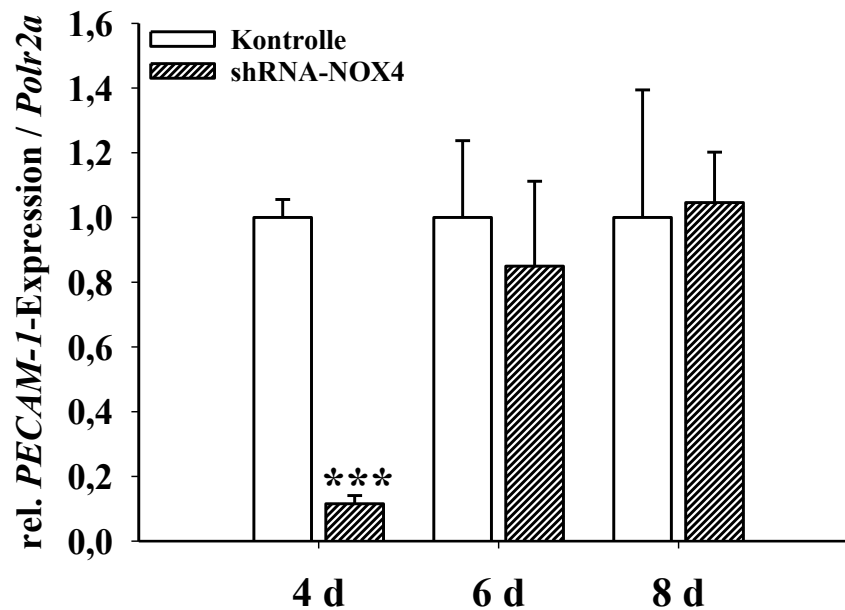


Abb. 33: Einfluss der shRNA-NOX4 auf die Expression des Endothelmarkers *PECAM-1*.

Relatives *PECAM-1*-Expressionsniveau in shRNA-NOX4-transduzierten CGR8-EBs am vierten, sechsten und achten Tag der Differenzierung im Vergleich zu Kontroll-CGR8-EBs. Die Daten wurden mittels Real-Time PCR erhoben und auf *Polr2a* normalisiert. Dargestellt sind MW \pm SD aus $n = 3$, *** $p < 0,001$ (Student's t -test).

Neben dem Nachweis der *PECAM-1*-Expression auf Transkriptionsebene erfolgte die Detektion auf Proteinebene mittels Western Blot-Analyse. Nach Gewinnung des Gesamtproteinextraktes, der Auftrennung in der SDS-Page und dem Transfer der Proteine erfolgte die Detektion mit dem spezifischen Antikörper PECAM-1 (Kap. 2.7).

In Abb. 34 A sind repräsentative Immunoblots des PECAM-1-Nachweises in shRNA-NOX1-transduzierten CGR8-EBs im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Ein Vergleich der Intensität der Banden zwischen der Kontrolle und den shRNA-NOX1-transduzierten CGR8-EBs ergab keinen nennenswerten Unterschied. Am vierten Tag war im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderung der PECAM-1-Synthese in den shNOX1-transduzierten CGR8-EBs zu verzeichnen. In den nächsten drei Messpunkten war die Synthese des PECAM-1-Proteins im Vergleich zu den Kontrollen um ca. 20 % geringer (Abb. 34 B).

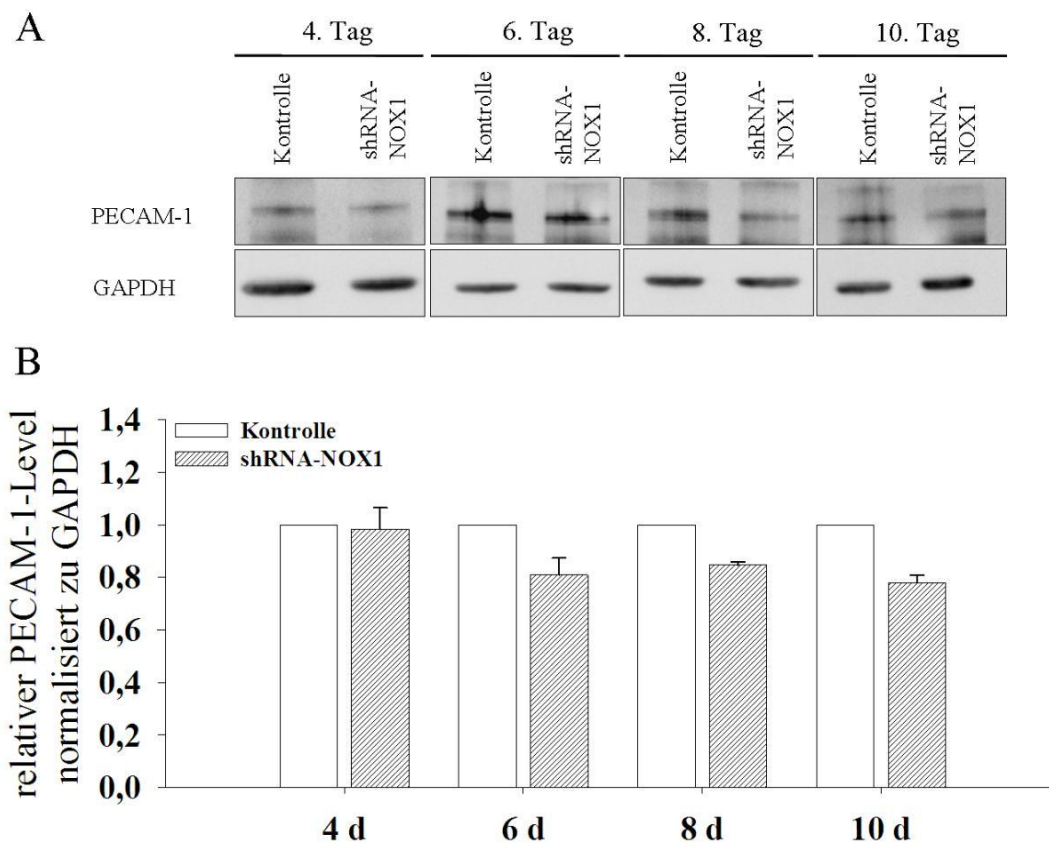


Abb. 34: Einfluss der shRNA-NOX1 auf die Synthese von PECAM-1.

Einfluss der shRNA-NOX1 auf die Synthese von PECAM-1 in vier, sechs, acht und zehn Tage alten CGR8-EBs. **(A)** Repräsentative Blots aus drei unabhängigen Versuchen. **(B)** Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung für PECAM-1 am vierten, sechsten, achten und zehnten Tag in shNOX1-transduzierten CGR8-EBs im Vergleich zu den Kontroll-CGR8-EBs. Dargestellt sind MW \pm SD aus n = 3. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

Wie in Abb. 35 **A** und **B** ersichtlich, wurde in den shRNA-NOX4-transduzierten CGR8-EBs ebenfalls der Gehalt an PECAM-1 im Vergleich zur Kontrolle untersucht. Die Auswertung der Bandenintensitäten am sechsten und zehnten Tag ergab einen reduzierten Gehalt an PECAM-1 (6. Tag = 0,5 und 10. Tag = 0,6) im Vergleich zur Kontrolle (6. Tag und 10. Tag = 1). Eine Zunahme an PECAM-1 war hingegen am achten Tag der Differenzierung in den shRNA-NOX4-transduzierten CGR8-EBs (8. Tag = 1,7) im Vergleich zur Kontrolle (8. Tag = 1) zu beobachten (Abb. 35 **B**).

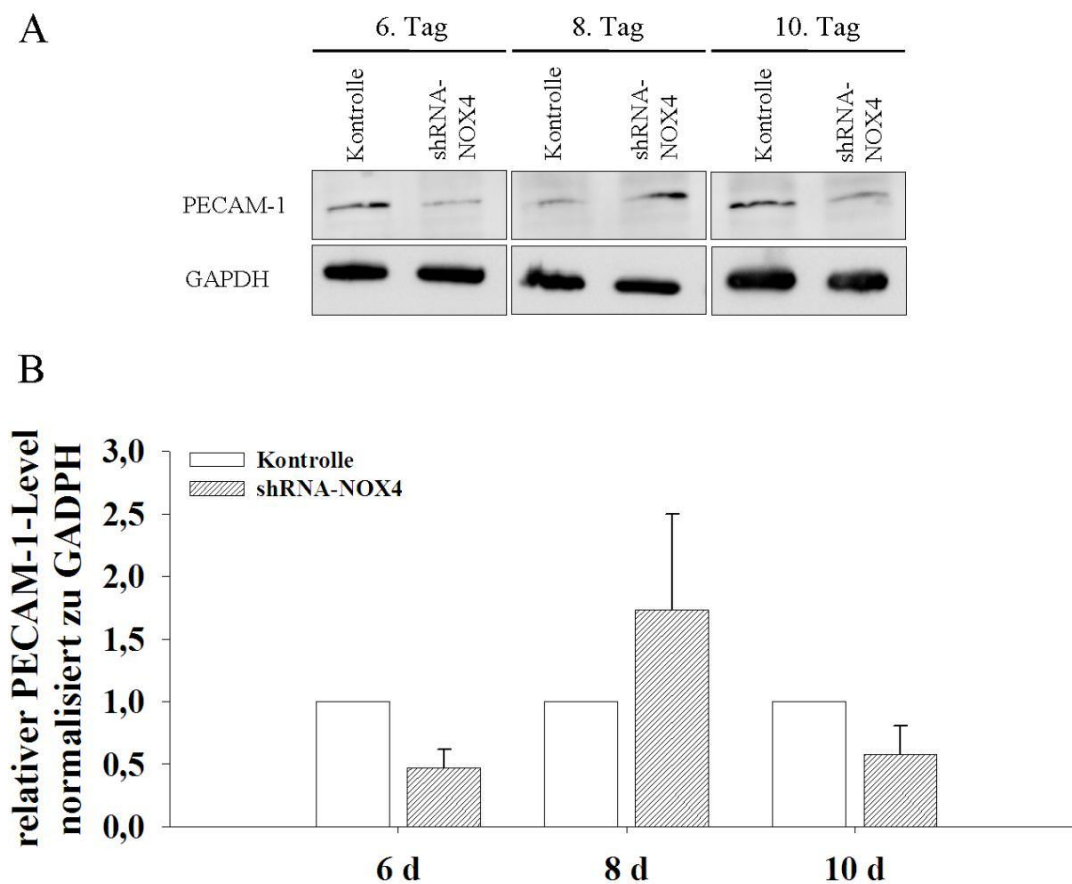


Abb. 35: Einfluss der shRNA-NOX4 auf die Synthese von PECAM-1.

Dargestellt ist der Einfluss der shRNA-NOX1 auf die Synthese von PECAM-1 in vier, sechs, acht und zehn Tage alten CGR8-EBs. (A) Repräsentative Blots aus drei unabhängigen Versuchen. (B) Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung für PECAM-1 am vierten, sechsten, achten und zehnten Tag in shNOX4-transduzierten CGR8-EBs im Vergleich zu den Kontroll-CGR8-EBs. Dargestellt sind $MW \pm SD$ aus $n = 3$. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

Die Quantifizierung des Proteingehalts erfolgte durch die Auswertung der Bandenintensität mit Hilfe der Auswertungssoftware MultiGauge V3.0 (Fujifilm). Die ermittelten Werte wurden gegen das Standardprotein GAPDH normalisiert.

Die Auswirkungen der Inaktivierung der NADPH-Oxidasen mittels shRNA auf die Ausbildung der Gefäßstruktur wurde immunfluoreszenzmikroskopisch durch die Detektion des Endothelmarkers PECAM-1 untersucht.

In Abb. 36 sind repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der Gefäßstruktur in shRNA-NOX1-, shRNA-NOX2- und shRNA-NOX4-transduzierten CGR8-EBs dargestellt. In den Kontroll-CGR8-EBs erfolgte eine Zunahme der Strukturierung als Funktion der Zeit. Es ist deutlich die Ausbildung geordneter Gefäßstrukturen zu erkennen.

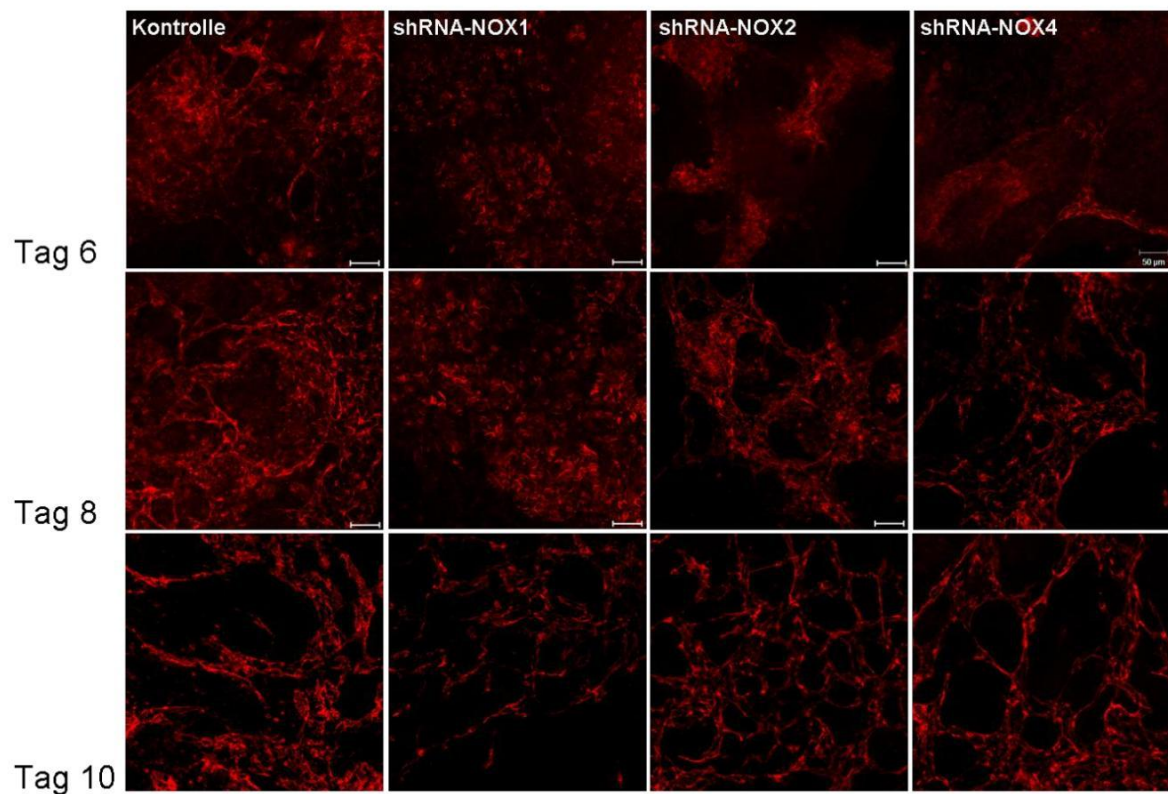


Abb. 36: Einfluss der shRNAs NOX1, NOX2 und NOX4 auf die Gefäßbildung.

Detektion des Endothelmarkers PECAM-1 in Aceton/Methanol-fixierten shRNA-NOX1-, NOX2- und NOX4-transduzierten CGR8-EBs im Vergleich zu nicht behandelten CGR8-EBs am sechsten, achten und zehnten Tag nach Differenzierungsbeginn. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten. Maßbalken entspricht 50 µm.

In den shRNA-NOX1-transduzierten CGR8-EBs bildeten sich die Blutgefäßstrukturen im Vergleich zur Kontrolle langsamer aus. Während in den Kontroll-CGR8-EBs am sechsten und achten Tag bereits längliche blutgefäßähnliche Strukturen zu erkennen waren, zeigten sich in den shRNA-NOX1-CGR8-EBs plättchenähnliche Strukturen. Am zehnten Tag der Differenzierung hingegen waren blutgefäßähnliche Strukturen in den shRNA-NOX1-CGR8-EBs sichtbar, wenn auch nicht so stark ausgebildet, wie in den Kontroll-CGR8-EBs. Die strukturelle Entwicklung der Gefäße in den shRNA-NOX2- und shRNA-NOX4-CGR8-EBs verläuft vergleichsweise ähnlich. Am sechsten Tag waren in ihnen weniger klare Strukturen zu sehen als in den Kontroll-CGR8-EBs, allerdings waren diese Strukturen deutlich besser ausgeprägt als in den shRNA-NOX1-EBs. Die jeweilige Genesis der Gefäße in den shRNA-NOX2- und shRNA-NOX4-CGR8-EBs am achten und zehnten Tag waren dagegen kaum von der Gefäßstruktur in den Kontroll-CGR8-EBs unterscheidbar.

4.6.2.4 Einfluss der NOX1-, NOX2- und NOX4-Unterdrückung auf die Kardiomyogenese

Einfluss auf die Kontraktibilität der CGR8-EBs

Sowohl die shRNA-transduzierten als auch die nichtbehandelten CGR8-ES-Zellen wurden für die Auszählung der kontrahierenden Areale zunächst in die Spinnerkultur zur Differenzierung übergeführt. Am vierten Tag der Kultivierung wurden die CGR8-EBs ausplattiert. Die Auszählung der kontrahierenden Areale erfolgte am zehnten Tag. Es wurden mindestens 25 EBs pro Ansatz ausgezählt.

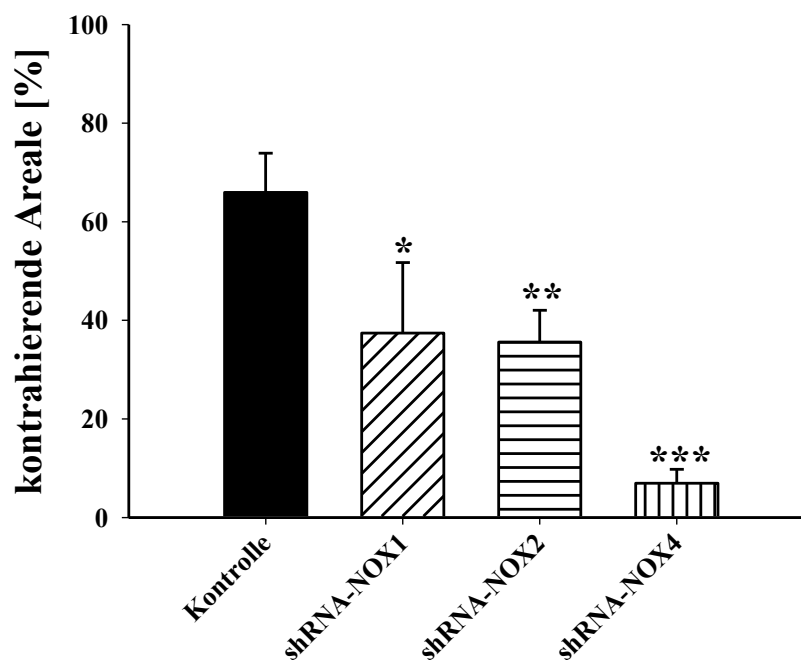


Abb. 37: Einfluss der shRNAs NOX1, NOX2 und NOX4 auf die Ausbildung kontrahierender Areale.

Auszählung der kontrahierenden Areale in shRNA-NOX-transduzierten CGR8-EBs am zehnten Tag der Differenzierung. Dargestellt sind MW \pm SD aus $n = 3$, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ (one-way ANOVA).

Abb. 37 zeigt das Ergebnis der Auszählung der spontan kontrahierenden Areale aus drei unabhängigen Versuchen. Die Gesamtpopulation ausgezählter CGR8-EBs wurde 100 % gesetzt und die kontrahierenden Areale prozentual darauf bezogen. In der Kontrolle kontrahierten am zehnten Tag 66 ± 8 % der ausgezählten CGR8-EBs. Die Anzahl der spontan kontrahierenden Areale in den shRNA-NOX1-transduzierten CGR8-EBs betrug 37 ± 14 % bezogen auf die ausgezählten CGR8-EBs, was einer signifikanten Verminderung von 29 % entspricht. Die Auszählung der schlagenden Areale in den shRNA-NOX2-transduzierten Zellen ergab einen prozentualen Anteil von 36 ± 6 % bezogen auf die Gesamtanzahl der gezählten CGR8-EBs. Somit war das Auftreten von spontan

schlagenden Arealen in den shRNA-NOX2-transduzierten CGR8-EBs um 30 % geringer als in den Kontroll-CGR8-EBs. Den deutlichsten Effekt auf die Ausbildung spontan kontrahierender Areale zeigte sich in den shRNA-NOX4-transduzierten CGR8-EBs. So schlugen lediglich 7 ± 3 % der ausgezählten CGR8-EBs, was einer Verringerung der kontrahierenden Areale um 59 % entspricht, bezogen auf die Kontrolle nichttransduzierter CGR8-EBs. Der Grund hierfür ist, dass die CGR8-Zellen, die den Leervektor aufweisen, in keinem der ausgeführten Experimente spontan kontrahierten.

Einfluss auf die Expression kardialer Marker

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass durch die Hemmung der NADPH-Oxidasen die Anzahl der spontan kontrahierenden Areale gegenüber der Kontrolle vermindert wird. Die deutlichste Auswirkung wurde dabei in den shRNA-NOX4-transduzierten Zellen beobachtet.

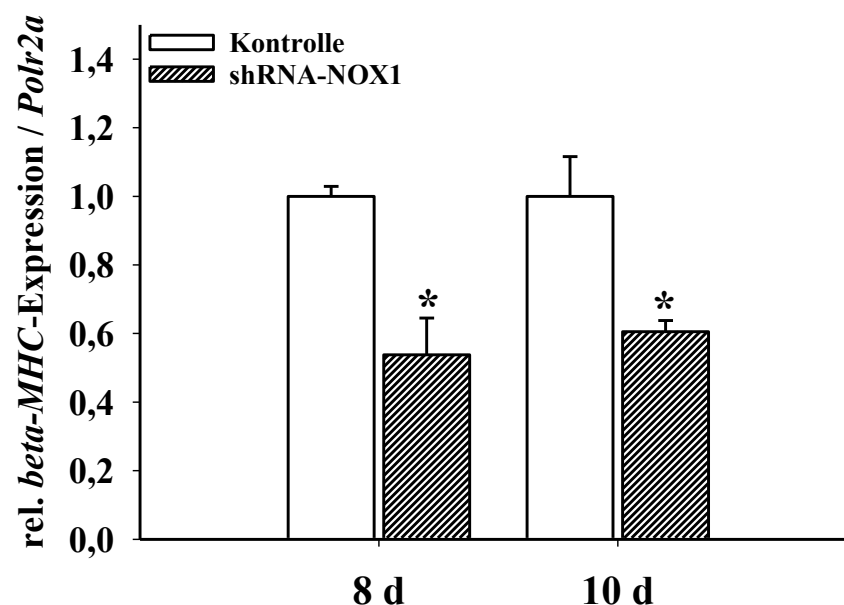


Abb. 38: Einfluss der shRNA-NOX1 auf die Expression des kardialen Markers *beta-MHC*.

Relatives *beta-MHC*-Expressionsniveau in shRNA-NOX1-transduzierten CGR8-EBs am achten und zehnten Tag der Differenzierung im Vergleich zu den Kontroll-CGR8-EBs. Die Daten wurden mittels Real-Time PCR erhoben und auf *Polr2a* normalisiert. Dargestellt sind die MW \pm SD aus $n = 3$, * $p < 0,05$ (Student's *t*-Test).

Von den shRNA-transduzierten CGR8-EBs wurden am achten und zehnten Tag RNA-Proben genommen und die Expression des *beta-MHC*-Genes mittels Real-Time PCR analysiert. In Abb. 38 ist das Auftreten des *beta-MHC*-Transkriptes in den shRNA-NOX1-

transduzierten CGR8-EBs, im Vergleich zur Kontrolle, dargestellt. Das Expressionsniveau der Kontrolle wurde in allen Fällen gleich 1 gesetzt. Am achten Tag war eine signifikante Herabregulierung der mRNA in den shRNA-NOX1-Zellen auf $0,54 \pm 0,11$ zu verzeichnen. Zwei Tage später war der Effekt auf dem gleichem Niveau und die Menge an mRNA ist auf $0,61 \pm 0,03$ (bezogen auf die Kontrolle) reduziert.

Die shRNA-NOX4-transduzierten CGR8-EBs wiesen, wie schon bei der Auszählung der schlagenden Areale beobachtet, den deutlichsten Effekt auf die Kardiomyogenese auf.

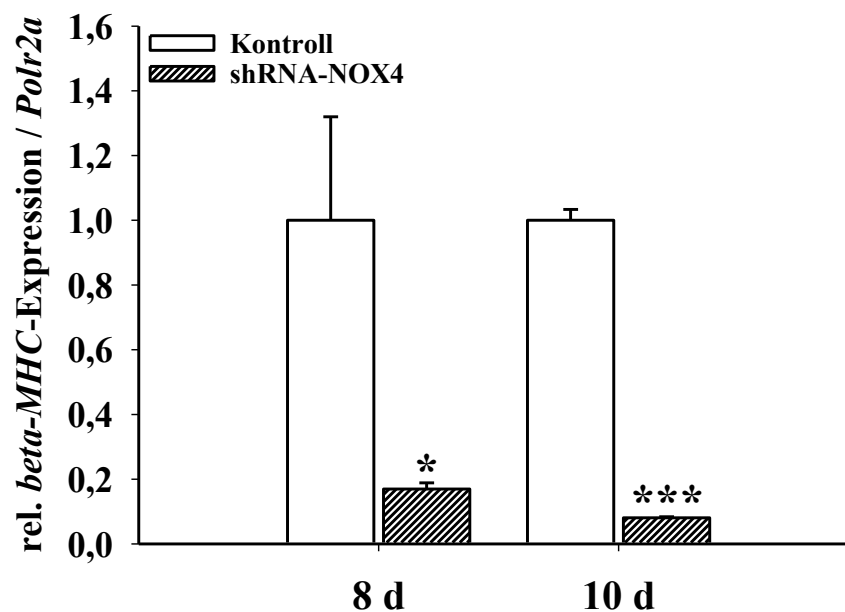


Abb. 39: Einfluss der shRNA-NOX4 auf die Expression des kardialen Markers *beta-MHC*.

Relatives *beta-MHC*-Expressionsniveau in shRNA-NOX4-transduzierten CGR8-EBs am achten und zehnten Tag der Differenzierung im Vergleich zu den Kontroll-CGR8-EBs. Die Daten wurden mittels Real-Time PCR erhoben und auf Polr2a normalisiert. Dargestellt sind die MW \pm SD aus $n = 3$, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (Student's *t*-Test).

Bereits am achten Tag der Differenzierung ist die Menge an *beta-MHC* in den shRNA-NOX4-transduzierten Zellen um das sechsfache geringer als in den Kontrollzellen (Abb. 39). Am zehnten Tag ist die Expression um das 12-fache ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle herabreguliert.

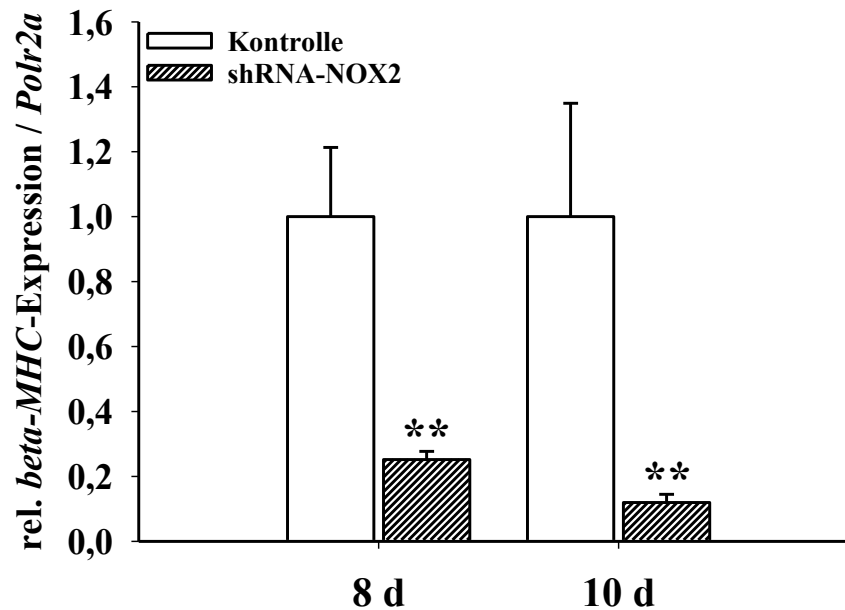


Abb. 40: Einfluss der shRNA-NOX2 auf die Expression des kardialen Markers *beta-MHC*.

Relatives *beta-MHC*-Expressionsniveau in shRNA-NOX2-transduzierten CGR8 am achten und zehnten Tag der Differenzierung im Vergleich zu den Kontroll-CGR8-EBs. Die Daten wurden mittels Real-Time PCR erhoben und auf *Polr2a* normalisiert. Dargestellt sind die MW \pm SD aus $n = 3$, ** $p < 0,01$ (Student's *t*-Test).

Die Expression von *beta-MHC* ist in den shRNA-NOX2-transduzierten Zellen ebenfalls geringer als in den Kontrollzellen. So war am achten Tag eine Verringerung auf $0,25 \pm 0,03$ und am zehnten Tag auf $0,12 \pm 0,03$ (achter Tag = $1 \pm 0,21$ und zehnter Tag = $1 \pm 0,35$) zu verzeichnen (Abb. 40). Diese Ergebnisse besitzen jedoch hypothetischen Charakter, da weiter oben gezeigt wurde, dass die shRNA-NOX2 auch einen negativen Einfluss auf die NOX4 ausübt. Es könnte sich somit um einen Artefakt handeln, indem eine Herabregulation der NOX4 durch die shRNA-NOX2 erfolgt.

Abb. 41 zeigt anhand repräsentativer Blots das Auftreten von alpha-Actinin und beta-MHC in zehn Tage alten shRNA-NOX1-transduzierten CGR8-EBs im Vergleich zum Auftreten derselben in der Kontrolle. Auf den Immunoblots ist zu erkennen, dass die Translation von alpha-Actinin auf 56 % (Abb. 41 A) und von beta-MHC auf 55 % (Abb. 41 B) in den shRNA-NOX1-transduzierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (100 %) herunterreguliert wird.

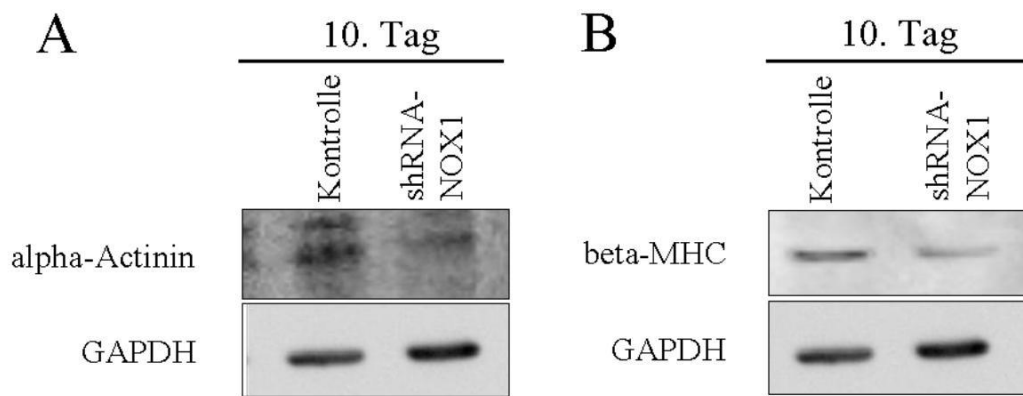


Abb. 41: Einfluss der shRNA-NOX1 auf die Synthese von alpha-Actinin und beta-MHC.

Detektion der Proteine alpha-Actinin (**A**) und beta-MHC (**B**) in shNOX1-transduzierten CGR8-EBs am zehnten Tag der Differenzierung. Dargestellt sind repräsentative Blots aus drei unabhängigen Versuchen. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich anhand der Betrachtung des Auftretens dieser Proteine in den shRNA-NOX4-transduzierten Zellen. Die repräsentativen Blots sind in Abb. 42 dargestellt. Am zehnten Tag war eine deutliche Herabregulierung des alpha-Actinins auf 54 % in den shRNA-transduzierten Zellen gegenüber der Kontrolle (100 %) zu erkennen (Abb. 42 **A**). Ebenfalls war eine deutliche Minderung des beta-MHC-Proteins in den transduzierten Zellen zu verzeichnen (Abb. 42 **B**). Im Vergleich zur Kontrolle (100 %) ist hier eine Halbierung in den shRNA-NOX4-transduzierten CGR8-EBs aufgetreten.

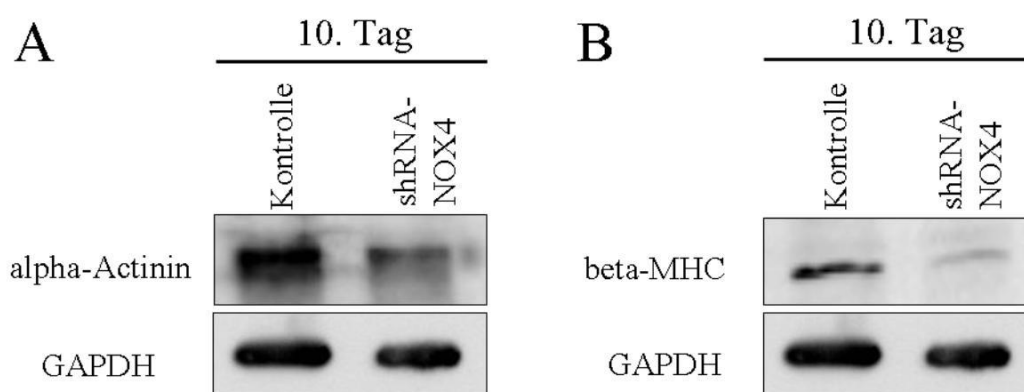


Abb. 42: Einfluss der shRNA-NOX4 auf die Synthese von alpha-Actinin und beta-MHC.

Detektion der Proteine alpha-Actinin (**A**) und beta-MHC (**B**) in shNOX4-transduzierten CGR8-EBs am zehnten Tag der Differenzierung. Dargestellt sind repräsentative Blots aus drei unabhängigen Versuchen. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

Die Quantifizierung des Proteingehalts erfolgte durch die Auswertung der Bandenintensität mit Hilfe der Auswertungssoftware MultiGauge V3.0 (Fujifilm). Die ermittelten Werte wurden gegen das Standardprotein GAPDH normalisiert.

5 Diskussion

Die NADPH-Oxidasen spielen in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen eine Rolle. Die Regulation dieser Prozesse erfolgt unter anderem über die Generierung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Die Untereinheiten des superoxidaniongenerierenden Enzymkomplexes NADPH-Oxidase wurden in einer breiten Anzahl von Organismen identifiziert, so zum Beispiel in Mammalia, Nematoden, Fruchtliegen, in Pflanzen, Pilzen und Schleimpilzen [Sumimoto, 2008]. Auf Grund dieses ubiquitären Auftretens der NADPH-Oxidasen ist zu erwarten, dass sie, neben der bereits gut bekannten Funktion in der Abwehr von Pathogenen [Babior et al., 1973], funktionelle Rollen in multiplen fundamentalen Prozessen der Zellbiologie innehaben. Eine wichtige Funktion, die für die NADPH-Oxidasen in der Literatur postuliert wird, ist die Beeinflussung der Zelldifferenzierung. Es existieren Hinweise, dass in einfachen Organismen, wie zum Beispiel dem Schleimpilz und in Pilzen, NADPH-Oxidase abgeleitete ROS eine essentielle Rolle in der Koordination der Zelldifferenzierung besitzen [Lardy et al., 2005]. Ebenfalls wurde gezeigt, dass die NADPH-Oxidasen bedeutende biologische Funktionen in der frühen Embryonalentwicklung in niederen Tieren haben [Wong and Wessel, 2005].

Ausgehend von diesen Literaturhinweisen, zeigen die durchgeführten Experimente die Rolle der NADPH-Oxidasen in Differenzierungsprozessen von höheren Mammalia auf, wobei als *In-Vitro*-Modellsystem die murine embryonale Stammzelllinie CGR8 dient. Diese Stammzelllinie differenziert unter geeigneten Kultivierungsbedingungen zum Beispiel in Kardiomyozyten und Endothelzellen [Maltsev et al., 1993, Wobus et al., 1991], so dass der Einfluss der NADPH-Oxidasen auf die Differenzierung zum einen durch pharmakologische Studien und zum anderen durch die Suppression der NADPH-Oxidaseexpression mittel shRNA-Technik effizient untersucht werden konnte.

5.1 Auftreten der NADPH-Oxidasen während der Differenzierung

Bevor der Einfluss der NADPH-Oxidasen auf das Differenzierungsgeschehen in dem *In-Vitro*-Modell-System CGR8 untersucht werden konnte, musste zunächst der basale Status der verschiedenen NOX-Isoformen im Verlauf der Differenzierung ermittelt werden. In den CGR8-EBs wurde lediglich das Auftreten der Isoformen NOX1, NOX2 und NOX4 untersucht, während die anderen Isoformen NOX3, NOX5 und die dualen Oxidasen Duox1 und Duox2 nicht in die Analyse eingingen. Die Gründe hierfür sind, dass

- (I) die NOX3 in dem hier verwendeten *In-Vitro*-Modell nicht oder nur marginal nachgewiesen werden konnte,
- (II) für die NOX5 bis heute in den gängigen Datenbanken keine Sequenzen für die Maus verfügbar sind und Hinweise existieren, dass sie in Nagetieren nicht vorkommt [Sumimoto, 2008] und
- (III) die DUOX1/2 hauptsächlich in der Schilddrüse vorkommen und ihre postulierte Funktion unter anderen im Einbringen von Jod in das Thyroidhormon liegt [De Deken et al., 2002].

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestimmung der NADPH-Oxidasen in einem Differenzierungszeitraum von 14 Tagen. Für die Isoform NOX4 wurde ein Maximum am sechsten Tag der Differenzierung nachgewiesen, was mit Literaturaussagen übereinstimmt. So wurde in der Arbeit von Li et al., die sich mit der Rolle der NOX4 in der Kardiomyozytendifferenzierung beschäftigt, ebenfalls eine Zeitkurve der NOX4 in CGR8-EBs über acht Tage erstellt, wobei in der frühen Entwicklungsphase der CGR8-EBs eine Zunahme der NOX4-Expression ab dem vierten Tag beschrieben wird [Li et al., 2006]. Dies stimmt weitestgehend mit den Beobachtungen der eigenen Arbeit überein (Kap. 4.1.1). Die Expression von NOX4 in diesen Zellen zeigt jedoch bereits am zweiten Tag einen signifikanten Anstieg und erreicht am sechsten Tag den Höhepunkt.

Für die Isoformen NOX1 und NOX2 existieren bis zum heutigen Zeitpunkt keine konkreten Aussagen in der Literatur über ihr zeitliches Auftreten während der Differenzierung in der murinen ES-Zelllinie CGR8. Ein Vergleich des gefundenen Maximums der Expression von NOX1 am sechsten Tag ist daher nicht gegeben. Die Arbeitsgruppe um Li untersuchte lediglich die NOX1-Expression in undifferenzierten ESC. Gegenläufig zu den hier gemachten Beobachtungen über das Vorkommen der NOX1, konnten sie die NOX1 in den CGR8-ES-Zellen nicht nachweisen [Li et al., 2006]. In einer anderen Arbeit wurden die NOX-Isoformen hinsichtlich ihres Auftretens in der murinen ES-Zelllinie CCE untersucht [Buggisch et al., 2007]. Hier wurde erstens ermittelt, dass NOX1 ein Maximum am sechsten Tag aufweist, wohingegen die NOX4 kontinuierlich in den CCE-EBs mit einem Maximum am 14. Tag exprimiert wird. Zweitens zeigen die Autoren, dass die Isoform NOX2 in einer späten Phase um dem zwölften Tag der Differenzierung hochreguliert wird. Diese späte Expression von NOX2 zeigt sich auch in den eigenen Untersuchungen der CGR8-EBs, worin ebenfalls ein deutlicher Anstieg am zwölften Tag der Differenzierung (Kap. 4.1.1) zu verzeichnen ist. Ferner sind sowohl die NOX1 und die NOX4 in den frühen Stadien exprimiert, wobei die Expression einen Höhepunkt am

sechsten Tag erfährt. Somit ist der sechste Tag in der Entwicklung der Stammzelllinie CGR8 kritisch. Die NOX2 hingegen ist bis zum achten Tag nur marginal in den CGR8-EBs exprimiert.

Einleitend wurde der Literatur entnommen, dass die Aktivierung der katalytischen Untereinheiten NOX1 und NOX2 von den regulatorischen Untereinheiten p47^{phox}/NOXO1 und p67^{phox}/NOXA1 abhängt. Die Expression dieser Untereinheiten wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Für die regulatorischen Untereinheiten p47^{phox} und p67^{phox}, welche zum Enzymkomplex NOX2 gehören, wurde eine Hochregulierung am zehnten Tag nach Beginn der Differenzierung in den CGR8-EBs beobachtet. Dies steht im Einklang mit dem Aufkommen der NOX2 in den CGR8-EBs. Im Gegensatz dazu sind die Untereinheiten NOXO1 und NOXA1, die für die Aktivierung der NOX1 mit verantwortlich sind, zu einem früheren Zeitpunkt der Differenzierung (zwischen zweitem und sechstem Tag) in den CGR8-EBs nachweisbar (Kap. 4.1.2). Diesen Ergebnissen zufolge scheinen besonders die Isoformen NOX1 und NOX4 eine Rolle in der frühen Differenzierungsphase des *In-Vitro*-Modells zu spielen.

5.2 Redoxstatus in den CGR8-EBs während der Differenzierung

Das Auftreten der NADPH-Oxidasen in den CGR8-EBs ist jedoch noch kein Hinweis darauf, dass sie regulierend in den Differenzierungsprozess eingreifen. Hierfür muss auch die Funktionalität der Proteine nachgewiesen werden. Dies wurde durch die Messung des Redoxstatus in den CGR8-EBs untersucht. Die Untersuchungen ergaben zu Beginn der Differenzierungsphase bis zum sechsten Tag einen linearen Anstieg der ROS in den Zellen um 50 %, wobei dieser erhöhte Wert bis zum gemessenen Endpunkt (14. Tag) auf ungefähr gleichem Niveau blieb. Diese Daten zeigen, dass sich während der Entwicklung von Zellen ihr Redoxstatus verändert. Um zu prüfen, ob die gemessenen ROS aus der NADPH-Oxidase generiert werden, erfolgte die Hemmung der NADPH-Oxidase-Aktivität mit den verbreitet eingesetzten Inhibitoren DPI, Apocynin und AEBSF sowie durch shRNA-vermittelte Unterdrückung der Expression der NADPH-Oxidasen. Die Messung der intrazellulären ROS erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff H₂DCH-DA, während der Superoxidanionlevel mit dem Fluoreszenzfarbstoff DHE detektiert wurde. In diesen Experimenten zeigte lediglich die Substanz DPI in den gemessenen Zeiträumen eine Verringerung der intrazellulären ROS-Generierung (Kap. 4.6.1.1). Dies ist nicht unbedingt auf die Inaktivierung der NADPH-Oxidasen in den CGR8-EBs zurückzuführen, da DPI auch die Aktivität anderer ROS-produzierender Enzymsysteme herabsetzen kann

[O'Donnell et al., 1993, Stuehr et al., 1991]. Gegenüber dem DPI zeigte Apocynin hingegen lediglich am zweiten Tag eine signifikant geringere ROS-Produktion als in den unbehandelten CGR8-EBs. An den späteren Messtagen war der ROS-Level in den behandelten CGR8-EBs gegenüber der Kontrolle vergleichbar. Ein möglicher Grund ist das vorherrschende Auftreten der Isoform NADPH-Oxidase 4 in dem *In-Vitro*-Modell CGR8. Denn in der Literatur finden sich Hinweise, dass diese Isoform nicht durch das Pharmakon Apocynin inaktiviert wird [Martyn et al., 2006]. Es ist auch in der Literatur beschrieben, dass Apocynin ein Prodrug ist und durch die Myeloperoxidase (MPO) aktiviert werden muss. Aus dieser Reaktion resultiert ein Apocynindimer, welches dann zur Hemmung der NADPH-Oxidase führt [Johnson et al., 2002]. Weiterhin postulieren Heumüller et al., dass Apocynin kein Inhibitor der vaskulären NADPH-Oxidase ist, sondern vielmehr als Antioxidanz wirkt. So beschreiben sie, dass in HEK293-Zellen, welche die NADPH-Oxidaseisoformen NOX1, NOX2 und NOX4 überexprimieren, die Inhibierung der Superoxidanionengenerierung durch Apocynin nicht gegeben ist [Heumüller et al., 2008].

Die vorgenommene Bestimmung der ROS- bzw. Superoxidanionengenerierung in den shRNA-transduzierten CGR8-EBs zeigte sowohl in den NOX1-, NOX2- als auch in den NOX4-defizienten Zellen keinen Unterschied. In allen ist jedoch im Vergleich zur Kontrolle tendenziell ein verringerter Level an ROS nachweisbar.

Diese Daten zeigen nur Tendenzen auf, da die Quantifizierung der intrazellulären H₂O₂-Bildung bzw. der Superoxidanionbildung, gemessen durch DCF bzw. durch DHE, limitiert ist.

5.3 NADPH-Oxidasen und ihre Rolle in der kardialen Differenzierung

Es ist bekannt, dass im dem verwendeten Modellsystem bereits unter basalen Kultivierungsbedingungen eine spontane Differenzierung der murinen embryonalen Stammzellen beobachtet werden kann. Im Differenzierungsmodell der Massenkultivierung in der Spinnerkultur nach Wartenberg et al. unterliegen die sich bildenden *Embryoid Bodies* (EBs) spezifischen morphologischen Veränderungen [Wartenberg et al., 1998]. Eine der eindrucksvollsten Phenotypen dieser EBs ist das Auftreten spontan kontrahierender Kardiomyozyten. Ferner ist vom hier angewandten System bekannt, dass die spontan kontrahierenden Areale am achten Tag der Differenzierung auftreten, was in den eigenen Experimenten bestätigt wurde. Maltsev et al. beschrieben, dass während der Kardiogenese als erstes mesodermale Gene, wie zum Beispiel Brachyury und BMP-4, exprimiert werden, gefolgt von der Expression kardialer Transkriptionsfaktoren Nkx2.5, GATA-4 und den

strukturegebenden kardialen Proteinen alpha-Actinin, alpha- und beta-MHC [Maltsev et al., 1993, Maltsev et al., 1994, Wobus, 2001]. Jüngst konnte in der Arbeitsgruppe Wartenberg gezeigt werden, dass das erste Auftreten von alpha- und beta-MHC im CGR8-Differenzierungsmodell zwischen dem fünften und siebenten Tag erfolgt, der kardiale Transkriptionsfaktor Nkx2.5 ab dem vierten Tag hochreguliert wird und sein Maximum am siebenten Tag der Differenzierung besitzt [Bartsch et al., in Vorbereitung]. Bereits 1997 publizierten Hescheler et al. das zeitliche Auftreten von alpha- und beta-MHC in der murinen ES-Zelllinie D3 [Hescheler et al., 1997].

Weiterhin ist in der Literatur beschrieben, dass die Differenzierung zu Kardiomyozyten vom Redoxstatus in den Zellen abhängig ist. So zeigen Sauer et al., dass durch die exogene Gabe geringer Mengen von H₂O₂ die Kardiomyogenese in der murinen CCE-Zelllinie induziert wird, während eine Vorinkubation mit Radikalfängern die Differenzierung der ES-Zellen zu Kardiomyozyten signifikant inhibiert [Sauer et al., 1999]. Diese Beobachtungen bestätigten sich auch an der embryonalen Zelllinie CGR8. Eine Behandlung der Zellen mit H₂O₂ in einem Konzentrationsbereich von 1 nM bis 100 nM führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der spontan kontrahierenden Areale [Li et al., 2006]. Höhere Konzentrationen von H₂O₂ (1000 nM) hingegen hatten einen negativen Effekt auf die Ausbildung kontrahierender Areale, sowohl in den CGR8- als auch in den CCE-EBs [Ateghang et al., 2006, Li et al., 2006]. Die Behandlung der CCE-EBs mit niedrigen H₂O₂-Konzentrationen führte neben der Zunahme der spontan kontrahierenden Areale zu einer signifikanten Erhöhung der kardialen Proteine alpha-Actinin und MLC2a (*Myosin Light Chain 2a*) [Buggisch et al., 2007]. Diesen Literaturaussagen kann entnommen werden, dass ROS, hier am Beispiel von H₂O₂ gezeigt, in der entsprechenden physiologischen Konzentration einen stimulierenden Einfluss auf die kardiale Differenzierung haben. Die eben erwähnten Effekte auf die Kardiomyogenese entstanden durch die exogene Gabe von ROS.

In der Zelle existieren aber auch Quellen, die endogen ROS produzieren können. Zu diesen Quellen gehören die NADPH-Oxidasen, auf denen der Hauptfokus dieser Arbeit liegt. Bedeutende Isoformen, denen eine Rolle in Differenzierungsprozessen zukommt, sind NOX1, NOX2 und NOX4, sie stellen die katalytischen Untereinheiten des Enzymkomplexes dar. Die Hauptaufgabe dieser Enzymkomplexe ist die Produktion von Superoxidanion aus molekularem Sauerstoff. Untersuchungen der Expression der NOX-Isoformen in EBs nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid ergaben eine signifikante Erhöhung von NOX1- und NOX4-mRNA [Buggisch et al., 2007].

Die Kardiomyogenese während der Differenzierung der EBs findet aber auch ohne die Zugabe von exogenen ROS statt. Diese Tatsache lässt vermuten, dass endogen entstehende ROS an diesen Prozessen beteiligt sein müssen. In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Gabe des NADPH-Oxidaseinhibitors DPI eine signifikante Herabregulierung der Anzahl spontan kontrahierender Areale an zehn Tage alten EBs beobachtet werden. Diese Resultate gehen konform mit den Beobachtungen aus der Arbeit von Li et al. [Li et al., 2006]. Hier konnte ebenfalls eine deutliche Verminderung schlagender Areale nach Behandlung mit DPI nachgewiesen werden. Die ermittelten Daten der beta-MHC-Expression in den DPI-behandelten EBs stimmt mit den Beobachtungen der Auszählung der kontrahierenden Areale überein. Hier wurde eine Verringerung der Expression auf 19 % im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Der Mechanismus von DPI beruht auf der Interaktion der Substanz mit der Flavoproteinkomponente der NADPH-Oxidase, die Bestandteil der katalytischen Untereinheit ist. DPI hemmt alle in dem *In-Vitro*-Modell vorkommenden Isoformen der NADPH-Oxidasen. Apocynin wird ebenfalls eingesetzt, um die Aktivität der NADPH-Oxidasen zu hemmen. Erste Erkenntnisse über inhibitorische Eigenschaften auf die NADPH-Oxidasen, wurden von Simons et al. beschrieben [Simons et al., 1990].

Die eigene Untersuchung der spontan kontrahierenden Areale nach Inkubation mit Apocynin ergab jedoch keinen Unterschied zu der Auszählung der kontrahierenden Areale in den nicht behandelten CGR8-EBs. Laut Literatur besitzt Apocynin eine Selektivität für die Isoformen NOX1, NOX2 und NOX3, deren Aktivität von den regulatorischen Untereinheiten (p47^{phox}/NOXA1 und p67^{phox}/NOXO1) abhängig sind [Opitz et al., 2007]. Die NOX4 hingegen ist unabhängig von regulatorischen Untereinheiten in den Zellen kontinuierlich aktiv [Ambasta et al., 2004, Martyn et al., 2006]. Diese Tatsache kann die eigene Beobachtung erklären, warum nach Behandlung mit Apocynin kein Effekt auf die Ausbildung kontrahierender Areale in den EBs auftrat. Im Gegensatz dazu wurde allerdings in der Arbeit von Buggisch et al. ein negativer Einfluss von Apocynin auf die Anzahl schlagender Areale in CCE-EBs festgestellt [Buggisch et al., 2007]. Entgegen den Beobachtungen der Anzahl der schlagenden Areale in den mit Apocynin behandelten CGR8-EBs, ergab die Expression des zum kontraktilen Apparat gehörenden Proteins beta-MHC eine 50 %ige Reduktion im Vergleich zur Kontrolle, wie in Abb. 28 ersichtlich. Dieses Ergebnis widerspricht den ermittelten Daten aus der Auszählung der schlagenden Areale.

AEBSF ist offenbar ein weiterer Hemmer der NADPH-Oxidaseaktivität. In der Literatur wird dieser als typischer Inhibitor der NOX2-beihaltenden NADPH-Oxidase

beschrieben [Diatchuk et al., 1997]. Der Wirkmechanismus ist dem des Apocynins sehr ähnlich. AEBFS verhindert die Bindung der regulatorischen Untereinheit p47^{phox} an die katalytische Komponente [Diatchuk et al., 1997]. Eine Studie von Wartenberg et al. zeigt allerdings auch einen inhibierenden Effekt durch AEBSF auf die Generierung von ROS in NOX1-überexprimierenden Tumorzellen [Wartenberg et al., 2005]. Die Aktivierung von NOX1 ist abhängig von den homologen Untereinheiten NOXO1 und NOXA1. Die Behandlung CGR8-EBs mit AEBSF ergab im Rahmen dieser Arbeit eine signifikante Steigerung der kontrahierenden Areale auf 32 %, wohingegen die Analyse von beta-MHC eine Reduzierung auf 65 % im Vergleich zu den unbehandelten EBs erbrachte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich in den pharmakologischen Studien ein deutlicher Effekt durch das DPI in Bezug auf die kardiale Differenzierung zeigte. Sie war im Vergleich zu den unbehandelten CGR8-EBs erheblich zurückgesetzt. Einen deutlich geringeren Effekt wurde durch die Behandlung mit Apocynin und AEBSF erreicht. Von diesen beiden Substanzen ist bekannt, dass sie die NOX1 und NOX2 hemmen, aber nicht die NOX4. Das lässt erwarten, dass vorwiegend die NOX4 an der kardialen Differenzierung beteiligt ist. Diese Vermutung wird auch durch die Arbeit von Li et al. unterstützt [Li et al., 2006].

Das Problem der nichtselektiven Hemmung der NADPH-Oxidasen wurde an verschiedenen Stellen schon erwähnt. Zur Lösung dieses Problems wurde in dieser Arbeit versucht, gezielt die Expression der NOX1, NOX2 und NOX4 durch Einbringen von shRNA zu unterdrücken. In der Unterdrückung der NOX4 durch die shRNA, zeigt sich ein deutlicher Effekt hinsichtlich der Anzahl der schlagenden Areale und der Expression von beta-MHC und alpha-Actinin. So wurde zum Beispiel sechzig Prozent weniger spontan kontrahierende Areale beobachtet und die Expression der kontraktilen Proteine war um die Hälfte geringer als in den nicht behandelten CGR8-EBs. Diese Beobachtungen werden auch durch bereits publizierte Daten unterstützt. Die Arbeit von Li et al., zeigt ebenfalls durch die Herabregulierung der NOX4 einen Einfluss auf die kardiale Differenzierung in ESC. Hieraus ziehen die Autoren den Schluss, dass die NOX4-abhängige ROS-Produktion eine kritische Rolle in der Kardiomyogenese spielt [Li et al., 2006]. Der erzielte unterdrückende Effekt auf die Anzahl der kontrahierenden Areale in NOX4-supprimierten Zellen konnte durch die exogene Gabe von Wasserstoffperoxid aufgehoben werden [Li et al., 2006]. Dies spricht gleichermaßen dafür, dass ROS in der physiologisch richtigen Konzentration an der Differenzierung von Zellen, in diesem Fall zu Kardiomyozyten,

beteiligt sind. Sowohl in der Literatur als auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die NOX4-abgeleiteten ROS die Differenzierung zu Kardiomyozyten forcieren.

Neben der NOX4 wird auch die Isoform NOX2 in Kardiomyozyten exprimiert [Byrne et al., 2003]. Weiterhin existieren Hinweise darauf, dass die NOX2 in adventitialen Fibroblasten vorkommt, wohingegen in kardialen Fibroblasten die NOX4 höher exprimiert ist als die NOX2. Die meisten Untersuchungen der ausgewerteten Literatur befassen sich mit der Bedeutung des oxidativen Stresses in der Pathophysiologie des Herzens. Eine Aufgabe der NOX2-beinhaltenen NADPH-Oxidase während der embryonalen Entwicklung ist in der Literatur nicht beschrieben.

In den eigenen Experimenten konnte ein Einfluss der NOX2-beinhaltenen NADPH-Oxidase nicht eindeutig gezeigt werden. Die Suppression der NOX2 mittels shRNA war nicht effizient. Es wurde lediglich eine Reduktion von 25 % – 30 % auf mRNA-Ebene erreicht und auf Proteinebene konnte kein Unterschied zur Kontrolle detektiert werden. Die Untersuchung der spontan kontrahierenden Areale in den shRNA-NOX2-transduzierten EBs ergab jedoch eine signifikante Verringerung im Vergleich zur Kontrolle. Die Untersuchung, ob das Einbringen der shRNA-NOX2 einen Einfluss auf die Expression der anderen Isoformen hat, zeigte einen supprimierenden Einfluss auf die NOX4. Somit könnte es sich bei den Beobachtungen in Bezug auf die kardiale Differenzierung um einen so genannten „Off-Target“-Effekt handeln (Kap. 5.5).

Das Vorkommen der NOX2 in den Kardiomyozyten des Herzens ist durch eine Vielzahl von Studien nachgewiesen [Krijnen et al., 2003, Meischl et al., 2006, Xiao et al., 2002]. Die NOX2 ist in adulten Kardiomyozyten die vorherrschende Isoform und an der Regulation von Redox-sensitiven Signalkaskaden, so zum Beispiel bei der Modulation von Kinasen und Phosphatasen [Sabri et al., 2003, Wenzel et al., 2001], der Genexpression, Proteaseaktivierung [Johar et al., 2006] und in der superoxidabhängigen NO-Inaktivierung [Kinugawa et al., 2005] beteiligt. Ein Vorkommen der NOX2 in sich entwickelnden Kardiomyozyten ist bisher nicht gesichert nachgewiesen. Li et al. beobachteten eine geringe NOX2-Expression in ESC und neonatalen Kardiomyozyten [Li et al., 2006]. Die eigene Analyse von NOX2 in den CGR8-EBs zeigte, wie schon erwähnt, ebenfalls eine geringe Expression zu Beginn der Untersuchung. Dass die NOX2-Enzyme eine Bedeutung in der Gewebeschädigung des Herzens besitzen, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Ausführliche Hinweise finden sich in den folgenden Studien:

- (I) Eine ischemia-induzierte NOX2-Expression führte *In-Vitro* zur Apoptose in Kardiomyozyten [Menshikov et al., 2006].

- (II) Der NOX2-Level ist in den Kardiomyozyten von Herzinfarktpatienten erhöht [Krijnen et al., 2003].
- (III) In koronaren Arterien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit zeigt sich eine Erhöhung von NOX2 und den regulatorischen Untereinheiten, sowie eine erhöhte ROS-Produktion [Guzik and Harrison, 2006].

Diesen Erkenntnissen widerspricht eine Studie, die an NOX2- und p47^{phox}-defizienten Mäusen durchgeführt wurde. Hier wurde den Mäusen ein myokardialer Infarkt impliziert. Sowohl in den Kontrollmäusen als auch in den defizienten Mäusen wurde kein Unterschied in der Größe des Infarkts festgestellt [Hoffmeyer et al., 2000]. Diese Studien, bei denen die Herzerkrankung im Fokus steht, lassen vermuten, dass die NOX2 im adulten Herzen wirken, speziell in der Pathologie und weniger an der embryonalen Entwicklung beteiligt sind. Vielmehr deuten die eigenen Befunde und die Literaturhinweise auf eine Bedeutung der NOX4-Isoform in der kardialen Differenzierung hin.

Die dritte Isoform, deren möglicher Einfluss auf die Differenzierung von ESC in die kardiale Richtung untersucht wurde, war die NOX1. In der Literatur sind keine eindeutigen Aussagen über die Verteilung in adulten und sich entwickelnden Kardiomyocyten zu finden. In der Arbeit von Banfi et al., die sich mit der Untersuchung der verschiedenen Splicevarianten der NOX1 befasst, konnte keine NOX1-Expression im adulten Herzen nachgewiesen werden [Banfi et al., 2000]. Schon Suh et al. weisen 1999 eine Gewebsverteilung von NOX1 im Kolon, in der Prostata und in Zellen der glatten Muskulatur nach [Suh et al., 1999]. Im Gegensatz dazu existiert eine Arbeit in der NOX1 in isolierten Kardiomyozyten nachgewiesen wird [Morawietz and Bornstein, 2006]. Das Vorkommen von NOX1 in sich entwickelnden Kardiomyozyten während der Differenzierung wird in der Literatur ebenfalls kontrovers beschrieben. Während die Gruppe von Li et al. an murinen ESC und neonatalen Kardiomyozyten keine NOX1 detektiert wird [Li et al., 2006], konnte an isolierten Kardiomyozyten aus CCE-EBs und neonatalen Kardiomyozyten von drei Tage alten Mäusen eine Expression von NOX1 verzeichnet werden, was sich sogar durch die Gabe von H₂O₂ steigern liess [Buggisch et al., 2007]. In der Arbeitsgruppe Wartenberg wurden aus den CGR8-EBs ebenfalls Kardiomyozyten isoliert und das Vorkommen der NOX-Isoformen untersucht. Hier konnte auch die NOX1-Isoform nachgewiesen werden [unveröffentlichte Daten, persönliche Mitteilung Wissuwa].

In den eigenen Experimenten zeigte die Herabregulierung der NOX1 mittels spezifischer shRNA eine Reduktion der schlagenden Areale um 37 % und auch die Expression der herzspezifischen Proteine beta-MHC und alpha-Actinin waren verringert,

allerdings bei weitem nicht so gravierend, wie in den CGR8-EBs, die einer Herabregulierung der NOX4 unterzogen wurden.

5.4 NADPH-Oxidasen und ihre Rolle in der Angiogenese

Die reaktiven Sauerstoffspezies haben neben ihrem Einfluss auf die kardiale Differenzierung auch Auswirkungen auf die Endothelzelldifferenzierung. Ist der Level von ROS in diesen Zellen niedrig, fördern sie die Proliferation und das Wachstum derselben und tragen somit zur Gefäßbildung und zur Angiogenese bei [Cai, 2005, Ushio-Fukai and Alexander, 2004]. Höhere ROS-Konzentrationen hingegen können eine Apoptoseantwort auslösen, den vaskulären Tonus modulieren, die endotheliale Barrierefunktion beeinträchtigen, die Thrombose und vaskuläre Remodelingprozesse fördern [Herkert et al., 2002, Taniyama and Griendling, 2003]. Erhöhte und anhaltende ROS-Produktion ist somit assoziiert mit verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen. So zeigen Sauer et al., dass das teratogene Thalidomid antiangiogene Eigenschaften in *Embryoid Bodies* durch eine erhöhte Produktion des Hydroxylradikals zur Folge hat [Sauer et al., 2000]. Ebenfalls wird ein negativer Effekt durch die Generierung von ROS auf die Ausbildung von blutgefäßähnlichen Strukturen in *Embryoid Bodies* in der Arbeit von Wartenberg et al. beschrieben. Hier erfolgt eine dosisabhängige Inhibierung der Angiogenese über eine Erhöhung der intrazellulären ROS durch das Antimalariamedikament Artemisinin [Wartenberg et al., 2003]. Die eben kurz erläuterten Literaturdaten zeigen den negativen Effekt der ROS auf die Entwicklung von Blutgefäßen.

Das verwendete Modell zur Untersuchung von Differenzierungsprozessen, ist in der Lage, spontan blutgefäßähnliche Strukturen auszubilden. In der Arbeit von Hannig et al. wurde die Expression des Endothelmarkers PECAM-1 in den CGR8-EBs über einen Differenzierungszeitraum von 16 Tagen untersucht. Die Ermittlung des Expressionsverlaufes des Endothelmarkers PECAM-1 während der Differenzierung in dem *In-Vitro*-Modell CGR8 zeigt einen Höhepunkt der Expression zwischen dem sechsten und achten Tag [Hannig et al., 2008]. Auch hier scheint der sechste Tag eine Rolle im Ablauf der Differenzierung zu spielen, wie bereits bei der kardialen Entwicklung festgestellt wurde.

Die vorgenommenen pharmakologischen Studien (Kap. 4.6.1) mit üblichen NADPH-Oxidaseinhibitoren ergaben, dass die PECAM-1-Expression am vierten Tag der Differenzierung signifikant geringer ist als in unbehandelten CGR8-EBs, auch am sechsten Tag ist noch eine geringere Expression zu verzeichnen. Allerdings zeigte sich am achten und zehnten Tag der Differenzierung kein nennenswerter Unterschied der PECAM-1-

Expression im Vergleich zur Kontrolle. Die Behandlung der CGR8-EBs mit den Inhibitoren erfolgte zu Beginn der Untersuchung für 24 Stunden, so dass sich nach einem gewissen Zeitraum die Aktivität der NADPH-Oxidasen offenbar wieder auf dem normalen Level einstellte. Die Differenzierung wird durch die Hemmung der NADPH-Oxidaseaktivität verzögert, was ein Indiz dafür ist, dass ROS in der Angiogenese eine Rolle spielt.

In den shRNA-Studien an den CGR8-EBs (Kap. 4.6.2) zeigte sich ein Einfluss auf die PECAM-1-Expression während der Entwicklung. Die Herabregulierung der NOX1 bewirkte am vierten bis sechsten Tag eine geringere PECAM-1-Expression, welche sich am achten Tag wieder der Kontrolle anpasste. Im Falle der Suppression von NOX4 zeigte sich nur am vierten Tag eine signifikante Veränderung in der PECAM-1-Expression. Am Ende des Untersuchungszeitraumes war kein Unterschied mehr zu den Kontrollen zu verzeichnen. Die Detektion von PECAM-1 in den shRNA-NOX2-transduzierten CGR8-EBs zeigte ebenfalls eine Reduktion dieses Endothelmarkers. Allerdings ist die Aussagekraft eingeschränkt, da die Effizienz der Suppression von NOX2 durch die shRNA unzureichend ist, wie bereits weiter oben erwähnt. Die erhaltenen Ergebnisse belegen, dass die Reduzierung der NADPH-Oxidasen zu Beginn der Differenzierung von ESC eine Verringerung der PECAM-1-Expression zur Folge hat, welche sich jedoch in der späteren Phase der Entwicklung wieder der Kontrolle angleicht.

Mehrere Literaturarbeiten zeigen, dass die NADPH-Oxidasen in die Proliferation von Endothelzellen involviert sind und die NOX2 durch verschiedene Stimulanzen in den Endothelzellen aktiviert wird [Frey et al., 2002, Ushio-Fukai et al., 2002]. Weiterhin konnte durch VEGF und Angiopoietin-1 die Migration von Endothelzellen über die Aktivierung der NOX2-beinhaltenen NADPH-Oxidase in mehreren Studien nachgewiesen werden [Abid et al., 2000, Colavitti et al., 2002, Ushio-Fukai et al., 2002]. Diese Arbeiten stützen die essentielle Rolle der NOX2 im Angiogeneseprozess. Petry et al. zeigen einen Einfluss der NOX2 und NOX4 auf die Proliferation und das Wachstum von Endothelzellen (EaHy926-Zellen und HMEC-1-Zellen). Sie beschreiben, dass eine Überexpression der NOX2 und NOX4 und der damit verbundenen Zunahme des ROS-Levels mit der Proliferation der Endothelzellen einhergeht. Wohingegen eine Suppression der beiden Enzyme zu einer Abnahme der ROS-Produktion und der Proliferation führt [Petry et al., 2006]. Die Suppression von NOX1, welches ebenfalls in diesen beiden Zelllinien nachgewiesen werden konnte, führte zu keiner Beeinflussung der ROS-Produktion. In der Arbeit von Dalta et al. wurde ebenfalls gezeigt, dass durch die Inhibierung der NOX4 mittels siRNA in HMEC- und HUVEC-Zellen die Angiogenese reduziert wird und die

Gefäßbildung sowie der Wundheilungsprozess beeinträchtigt werden [Datla et al., 2007]. Diese Effekte werden durch die Gabe von exogenem H_2O_2 und dem Antioxidanz Ebselen aufgehoben. In Gegensatz dazu führt eine Überexpression von NOX4 zu einer Steigerung der Migration und Proliferation von Endothelzellen. Die Überexpression der NOX4 bewirkt ferner die Phosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen und die Aktivierung von ERK (*Extracellular Signal-regulated Kinase*) [Datla et al., 2007]. Eine Inhibierung dieses Signalweges hatte eine Reduzierung der Angiogenese zur Folge.

In den eigenen Beobachtungen des Einflusses der NADPH-Oxidasen auf die Angiogenese wurde zu Beginn der Differenzierung sowohl in den pharmakologischen als auch in den shRNA-vermittelten Experimenten eine verringerte PECAM-1-Expression und eine weniger starke Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen den CGR8-EBs festgestellt. Allerdings erfolgt mit der Zeit eine Angleichung der PECAM-1-Expression sowie der Ausbildung der Strukturen an das Niveau nicht behandelter Zellen. Infolgedessen scheint die Unterdrückung der NADPH-Oxidasen verzögernd auf die Differenzierung zu wirken.

5.5 Pharmakologische versus shRNA-vermittelte NADPH-Oxidase-Hemmung

In der eigenen Arbeit wurden zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze verfolgt, um den Einfluss der NADPH-Oxidasen auf das Differenzierungsgeschehen in dem *In-Vitro*-Modell *Embryoid Body*, abgeleitet von der murinen CGR8-ES-Zelllinie, zu untersuchen. Zum einen wurde auf der Basis pharmakologischer Substanzen gearbeitet und zum anderen wurden CGR8-ES-Zelllinien etabliert, die in der Lage sind, shRNA gegen die NOX-Isoformen 1, 2 und 4 zu produzieren. Die Ergebnisse der beiden experimentellen Ansätze unterscheiden sich hauptsächlich darin, dass in der pharmakologischen Studie die Aktivität der NOX-Enzyme ab dem dritten Tag der Differenzierung durch Applikation der NOX-Inhibitoren negativ beeinträchtigt wurde, während die Supprimierung der NOX-Isoformen in der shRNA-Studie bereits zu Beginn der Differenzierung erfolgte.

An diesem Punkt stellt sich natürlich die Frage, warum zur Herabregulierung der NOX-Isoformen nicht die siRNA am dritten Tag der Differenzierung eingesetzt wurde, um den Einfluss der NOX-Enzyme auf die Differenzierung in den beiden unterschiedlichen Ansätze besser mit einander vergleichen zu können. So kann der Einsatz der siRNA zwar frei gewählt und diese mittels Transfektion in die Zielzellen gebracht werden, jedoch unterliegt sie dort den natürlichen Abbauprozessen der Zellen, wodurch nur eine transiente Herabregulierung der gewünschten Gene stattfinden kann. Dies zeigt eine Studie von Ohrt

et al., die mit Hilfe einer siRNA, die am 3'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert war, dass bereits nach 48 Stunden nur noch 1 % Fluoreszenz in den Zellen auftritt [Ohr et al., 2006]. Dies impliziert, dass die siRNA zu diesem Zeitpunkt degradiert und somit ihre Funktion nicht mehr gegeben ist. Weiterhin ist durch die dreidimensionale Struktur der CGR8-EBs die vollständige Aufnahme der siRNA in allen Zellen nicht gewährleistet. Im Gegensatz dazu erfolgt die Synthese der shRNA kontinuierlich durch die Wirtszelle selbst [Cullen, 2005]. Aus diesem Grund kann die siRNA nicht zur zeitlichen Übereinstimmung der pharmakologischen Studie eingesetzt werden.

Ein negativer Aspekt der RNAi-Untersuchungen ist das Auftreten von „*Off-Target*“-Effekten. So werden unabsichtliche Effekte auf die Genexpression bezeichnet, die durch die RNAi vermittelt werden, wobei sie in spezifische und nichtspezifische „*Off-Target*“-Effekte unterteilt werden. Spezifische „*Off-Target*“-Effekte werden durch partielle Sequenzkomplementarität des RNAi-Konstruktes zu anderen mRNAs vermittelt. Nichtspezifische „*Off-Target*“-Effekte hingegen umfassen eine große Vielfalt an immunologischen und toxischen Effekte, die durch das RNAi-Konstrukt selbst oder durch dessen Freisetzungsvehikel zum tragen kommen können. So zum Beispiel zeigen Bridge et al., dass shRNA-Konstrukte eine Interferonantwort in Mammaliazellen auslösen können [Bridge et al., 2003].

Ein Vorteil der pharmakologischen Untersuchungen ist der geringere experimentelle Aufwand. Jedoch ist als Nachteil zu sehen, wie weiter oben erwähnt, das durch die eingesetzten NADPH-Oxidaseinhibitoren DPI, Apocynin und AEBSF keine bzw. nur eine bedingte Selektivität im Bezug auf die einzelnen Isoformen der NADPH-Oxidasen gegeben ist.

5.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der verschiedenen NADPH-Oxidasen auf die Differenzierung der murinen CGR8-Stammzelllinie untersucht. Aufgrund der genannten Defizite der eingesetzten Pharmaka und der möglichen Übernahme der Funktion von anderen NADPH-Oxidasen, die nicht einer Hemmung unterliegen, war eine eindeutige Klärung, welche der NOX-Isoformen an welchen Differenzierungswegen beteiligt sind, nicht möglich. In weiterführenden Experimenten kann die konditionelle bzw. induzierbare RNAi genutzt werden, um gezielt die Expression einer shRNA zu einem definierten Zeitpunkt anzuschalten. In der Regel wird dies durch die Modifikation des Pol III-Promoters erreicht, wobei Elemente des Cre/LoxP-Rekombinationssystems [Kasim et al.,

2004] bzw. des Tetrazyklinsystems (Tet-System) in die Promotorsequenz des shRNA-Konstruktes eingebaut werden. Das Tet-System wird in Tet^{on} und Tet^{off} unterteilt. [Gossen and Bujard, 1992]. Bei einem Tet^{on}-System bindet ein Tetrazyklin-Repressor (Tet^R) an die Sequenz eines Tetrazyklin-Operators (Tet^O), welcher in die Pol III-Promotorregion des shRNA-Expressionskonstruktes integriert wird. Die Expression der shRNA kann dann nicht erfolgen – das System ist *ausgeschaltet*. Durch Applikation des Tetrazyklin-Antibiotikums Doxyzyklin erfährt der Tet^R eine Konformationsänderung und löst sich vom Operator und es kommt zur Pol III-vermittelten Expression der shRNA – das System ist *angeschaltet* [Matsukura et al., 2003]. Bei einem Tet^{off}-System hingegen wird die Expression in Gegenwart von Doxyzyklin verhindert [Raoul et al., 2006].

Eine weitere Möglichkeit wäre die simultane Unterdrückung der verschiedenen NOX-Isoformen. Dies kann ebenfalls über die RNAi erfolgen, indem man so genannte Tandem-Expressionsvektoren konstruiert. So ist es möglich ein Konstrukt mit unterschiedlichen, fortlaufenden shRNA-Expressionskassetten zu designen [Gonzalez et al., 2005, Jazag et al., 2005]. Eine andere Variante ist die Etablierung eines bispezifischen shRNA-Konstruktes. Hier sind zwei unterschiedliche shRNA-Konstrukte aneinandergereiht und durch einen acht Nukleotide langen Spacer unterbrochen [Anderson et al., 2003]. Mit diesen Techniken wäre es möglich zwei der drei untersuchten Isoformen zu unterdrücken.

Ein weiteres Untersuchungsfeld eröffnet die Möglichkeit, in den CRG8-ES-Zellen eine Überexpression der NOX-Isoformen zu induzieren und das Differenzierungsverhalten der Zellen im Hinblick auf die Entwicklung von Kardiomyozyten und Endothelzellen auszuwerten. Mit diesen weiterführenden Experimenten, besteht die Aussicht, den Einfluss der NOX-Isoformen und ihre Signalwege differenzierter aufzuklären.

6 Literaturverzeichnis

- Abe K, Niwa H, Iwase K, Takiguchi M, Mori M, Abe SI, Abe K, Yamamura KI: Endoderm-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies. *Exp Cell Res* 1996;229:27-34.
- Abid MR, Kachra Z, Spokes KC, Aird WC: NADPH oxidase activity is required for endothelial cell proliferation and migration. *FEBS Lett* 2000;486:252-256.
- Ago T, Kuribayashi F, Hiroaki H, Takeya R, Ito T, Kohda D, Sumimoto H: Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4474-4479.
- Al-Mehdi AB, Zhao G, Dodia C, Tozawa K, Costa K, Muzykantov V, Ross C, Blecha F, Dinauer M, Fisher AB: Endothelial NADPH oxidase as the source of oxidants in lungs exposed to ischemia or high K⁺. *Circ Res* 1998;83:730-737.
- Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, Schmidt HH, Busse R, Brandes RP: Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2004;279:45935-45941.
- Anderson J, Banerjee A, Akkina R: Bispecific short hairpin siRNA constructs targeted to CD4, CXCR4, and CCR5 confer HIV-1 resistance. *Oligonucleotides* 2003;13:303-312.
- Arbiser JL, Petros J, Klafter R, Govindajaran B, McLaughlin ER, Brown LF, Cohen C, Moses M, Kilroy S, Arnold RS, Lambeth JD: Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:715-720.
- Aslakson CJ, Miller FR: Selective Events in the Metastatic Process Defined by Analysis of the Sequential Dissemination of Subpopulations of a Mouse Mammary Tumor. 1992:1399-1405.
- Ateghang B, Wartenberg M, Gassmann M, Sauer H: Regulation of cardiotrophin-1 expression in mouse embryonic stem cells by HIF-1 α and intracellular reactive oxygen species. *J Cell Sci* 2006;119:1043-1052.
- Babior BM: NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999;93:1464-1476.
- Babior BM: Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000;109:33-44.
- Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT: Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 1973;52:741-744.
- Baldrige C, Gerard R: The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 1933;103:235-236.
- Banfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH: NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem* 2004;279:46065-46072.
- Banfi B, Maturana A, Jaconi S, Arnaudeau S, Laforge T, Sinha B, Ligeti E, Demaurex N, Krause KH: A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science* 2000;287:138-142.

- Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demaurex N, Krause KH: A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* 2001;276:37594-37601.
- Barford D: The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. *Curr Opin Struct Biol* 2004;14:679-686.
- Basu K, Dasgupta B, Bhattacharya SK, Debnath PK: Chemistry and pharmacology of apocynin, isolated from *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth. *Curr Sci* 1971;40:603-604.
- Bayraktutan U, Draper N, Lang D, Shah AM: Expression of functional neutrophil-type NADPH oxidase in cultured rat coronary microvascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 1998;38:256-262.
- BelAiba RS, Djordjevic T, Petry A, Diemer K, Bonello S, Banfi B, Hess J, Pogrebniak A, Bickel C, Gorlach A: NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2007;42:446-459.
- Boveris A, Chance B: The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973;134:707-716.
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R: Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 2003;34:263-264.
- Buggisch M, Ateghang B, Ruhe C, Strobel C, Lange S, Wartenberg M, Sauer H: Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase. *J Cell Sci* 2007;120:885-894.
- Byrne JA, Grieve DJ, Bendall JK, Li JM, Gove C, Lambeth JD, Cave AC, Shah AM: Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2003;93:802-805.
- Cai H: Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res* 2005;68:26-36.
- Cayatte AJ, Rupin A, Oliver-Krasinski J, Maitland K, Sansilvestri-Morel P, Boussard MF, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Cohen RA: S17834, a new inhibitor of cell adhesion and atherosclerosis that targets nadph oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1577-1584.
- Chan YR, Zanetti M, Gennaro R, Gallo RL: Anti-microbial activity and cell binding are controlled by sequence determinants in the anti-microbial peptide PR-39. *J Invest Dermatol* 2001;116:230-235.
- Cheng G, Ritsick D, Lambeth JD: Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox. *J Biol Chem* 2004;279:34250-34255.
- Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, Galeotti T: Reactive Oxygen Species as Downstream Mediators of Angiogenic Signaling by Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2/KDR. *J Biol Chem* 2002;277:3101-3108.
- Compton SJ, Jones CG: Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 1985;151:369-374.

- Cross AR, Jones OT: The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem J* 1986;237:111-116.
- Cullen BR: RNAi the natural way. *Nat Genet* 2005;37:1163-1165.
- Datla SR, Peshavariya H, Dusting GJ, Mahadev K, Goldstein BJ, Jiang F: Important role of Nox4 type NADPH oxidase in angiogenic responses in human microvascular endothelial cells in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2319-2324.
- De Deken X, Wang D, Dumont JE, Miot F: Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H₂O₂-generating system. *Exp Cell Res* 2002;273:187-196.
- DeLeo FR, Quinn MT: Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Biol* 1996;60:677-691.
- DeLeo FR, Yu L, Burritt JB, Loetterle LR, Bond CW, Jesaitis AJ, Quinn MT: Mapping sites of interaction of p47-phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7110-7114.
- Denu JM, Tanner KG: Specific and Reversible Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatases by Hydrogen Peroxide: Evidence for a Sulfenic Acid Intermediate and Implications for Redox Regulation. *Biochemistry* 1998;37:5633-5642.
- Diatchuk V, Lotan O, Koshkin V, Wikstroem P, Pick E: Inhibition of NADPH oxidase activation by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and related compounds. *J Biol Chem* 1997;272:13292-13301.
- Ding Y, Chen ZJ, Liu S, Che D, Vetter M, Chang CH: Inhibition of Nox-4 activity by plumbagin, a plant-derived bioactive naphthoquinone. *J Pharm Pharmacol* 2005;57:111-116.
- Djordjevic T, Pogrebniak A, BelAiba RS, Bonello S, Wotzlaw C, Acker H, Hess J, Gorlach A: The expression of the NADPH oxidase subunit p22phox is regulated by a redox-sensitive pathway in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2005;38:616-630.
- Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R: The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 1985;87:27-45.
- Drab M, Haller H, Bychkov R, Erdmann B, Lindschau C, Haase H, Morano I, Luft FC, Wobus AM: From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model. *Faseb J* 1997;11:905-915.
- Evans MJ, Kaufman MH: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-156.
- Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B, Barsoum J: Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:664-668.
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F: Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-1530.

- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL: Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996;16:4604-4613.
- Frey RS, Rahman A, Kefer JC, Minshall RD, Malik AB: PKCzeta regulates TNF-alpha-induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. *Circ Res* 2002;90:1012-1019.
- Fridovich I: Quantitative Aspects of the Production of Superoxide Anion Radical by Milk Xanthine Oxidase. *J Biol Chem* 1970;245:4053-4057.
- Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL: Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8010-8014.
- Geiszt M, Lekstrom K, Leto TL: Analysis of mRNA transcripts from the NAD(P)H oxidase 1 (Nox1) gene. Evidence against production of the NADPH oxidase homolog-1 short (NOH-1S) transcript variant. *J Biol Chem* 2004;279:51661-51668.
- Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X: Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes* 2005;54:311-321.
- Gonzalez S, Castanotto D, Li H, Olivares S, Jensen MC, Forman SJ, Rossi JJ, Cooper LJ: Amplification of RNAi-targeting HLA mRNAs. *Mol Ther* 2005;11:811-818.
- Gossen M, Bujard H: Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5547-5551.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M: NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000;86:494-501.
- Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, Rittinger K: Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* 2003;113:343-355.
- Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S: Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986;320:454-456.
- Guzik TJ, Harrison DG: Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. *Drug Discov Today* 2006;11:524-533.
- Ha H, Lee HB: Reactive oxygen species amplify glucose signalling in renal cells cultured under high glucose and in diabetic kidney. *Nephrology (Carlton)* 2005;10 Suppl:S7-10.
- Hannig M, Figulla HR, Sauer H, Wartenberg M: Control of leukocyte differentiation from embryonic stem cells upon vasculogenesis and confrontation with tumour tissue. *J Cell Mol Med* 2008.
- Harper RW, Xu C, Soucek K, Setiadi H, Eiserich JP: A reappraisal of the genomic organization of human Nox1 and its splice variants. *Arch Biochem Biophys* 2005;435:323-330.
- Heinzel B, John M, Klatt P, Bohme E, Mayer B: Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J* 1992;281 (Pt 3):627-630.
- Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM: Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein

diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* 1999;27:146-159.

Herkert O, Diebold I, Brandes RP, Hess J, Busse R, Gorlach A: NADPH Oxidase Mediates Tissue Factor-Dependent Surface Procoagulant Activity by Thrombin in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation* 2002;105:2030-2036.

Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM, Addicks K: Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* 1997;36:149-162.

Hescheler J, Fleischmann BK, Wartenberg M, Bloch W, Kolossov E, Ji G, Addicks K, Sauer H: Establishment of ionic channels and signalling cascades in the embryonic stem cell-derived primitive endoderm and cardiovascular system. *Cells Tissues Organs* 1999;165:153-164.

Heumuller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HH, Busse R, Schroder K, Brandes RP: Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension* 2008;51:211-217.

Hoffmeyer MR, Jones SP, Ross CR, Sharp B, Grisham MB, Laroux FS, Stalker TJ, Scalia R, Lefer DJ: Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in NADPH Oxidase-Deficient Mice. *Circ Res* 2000;87:812-817.

Holland PC, Clark MG, Bloxham DP, Lardy HA: Mechanism of action of the hypoglycemic agent diphenyleneiodonium. *J Biol Chem* 1973;248:6050-6056.

Hunter T: Signaling-2000 and beyond. *Cell* 2000;100:113-127.

Iyer GY, Nair MS, Sukumaran M: Metabolic effects of alpha-oxobutyric acid: effect on respiration of rat-liver homogenates. *Biochem J* 1961;78:766-769.

Jazag A, Kanai F, Ijichi H, Tateishi K, Ikenoue T, Tanaka Y, Ohta M, Imamura J, Guleng B, Asaoka Y, Kawabe T, Miyagishi M, Taira K, Omata M: Single small-interfering RNA expression vector for silencing multiple transforming growth factor-beta pathway components. *Nucleic Acids Res* 2005;33:e131.

Jensen PK: Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles. I. pH dependency and hydrogen peroxide formation. *Biochim Biophys Acta* 1966;122:157-166.

Johar S, Cave AC, Narayanapanicker A, Grieve DJ, Shah AM: Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *Faseb J* 2006;20:1546-1548.

Johnson DK, Schillinger KJ, Kwait DM, Hughes CV, McNamara EJ, Ishmael F, O'Donnell RW, Chang MM, Hogg MG, Dordick JS, Santhanam L, Ziegler LM, Holland JA: Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. *Endothelium* 2002;9:191-203.

Kasim V, Miyagishi M, Taira K: Control of siRNA expression using the Cre-loxP recombination system. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e66.

- Katsuyama M, Fan C, Yabe-Nishimura C: NADPH oxidase is involved in prostaglandin F₂alpha-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells: induction of NOX1 by PGF₂alpha. *J Biol Chem* 2002;277:13438-13442.
- Kawahara T, Ritsick D, Cheng G, Lambeth JD: Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. *J Biol Chem* 2005;280:31859-31869.
- Keller A, Mohamed A, Drose S, Brandt U, Fleming I, Brandes RP: Analysis of dichlorodihydrofluorescein and dihydrocalcein as probes for the detection of intracellular reactive oxygen species. *Free Radic Res* 2004;38:1257-1267.
- Kikuchi H, Hikage M, Miyashita H, Fukumoto M: NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene* 2000;254:237-243.
- Kinugawa S, Zhang J, Messina E, Walsh E, Huang H, Kaminski PM, Wolin MS, Hintze TH: gp91phox-containing NAD(P)H oxidase mediates attenuation of nitric oxide-dependent control of myocardial oxygen consumption by ANG II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H862-867.
- Kobzik L, Godleski JJ, Brain JD: Oxidative metabolism in the alveolar macrophage: analysis by flow cytometry. *J Leukoc Biol* 1990;47:295-303.
- Kojima S, Nomura T, Ichio T, Kajiwarra Y, Kitabatake K, Kubota K: Inhibitory effect of neopterin on NADPH-dependent superoxide-generating oxidase of rat peritoneal macrophages. *FEBS Lett* 1993;329:125-128.
- Kramer J, Hegert C, Guan K, Wobus AM, Muller PK, Rohwedel J: Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev* 2000;92:193-205.
- Krijnen PA, Meischl C, Hack CE, Meijer CJ, Visser CA, Roos D, Niessen HW: Increased Nox2 expression in human cardiomyocytes after acute myocardial infarction. *J Clin Pathol* 2003;56:194-199.
- Kwon J, Qu CK, Maeng JS, Falahati R, Lee C, Williams MS: Receptor-stimulated oxidation of SHP-2 promotes T-cell adhesion through SLP-76-ADAP. *Embo J* 2005;24:2331-2341.
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
- Lambeth JD: NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004;4:181-189.
- Lambeth JD: Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases. *Curr Opin Hematol* 2002;9:11-17.
- Lardy B, Bof M, Aubry L, Paclet MH, Morel F, Satre M, Klein G: NADPH oxidase homologs are required for normal cell differentiation and morphogenesis in Dictyostelium discoideum. *Biochim Biophys Acta* 2005;1744:199-212.
- Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK: Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 2001;88:888-894.

- Leahy A, Xiong JW, Kuhnert F, Stuhlmann H: Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J Exp Zool* 1999;284:67-81.
- Lee SR, Kwon KS, Kim SR, Rhee SG: Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1998;273:15366-15372.
- Li J, Stouffs M, Serrander L, Banfi B, Bettiol E, Charnay Y, Steger K, Krause KH, Jaconi ME: The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: Role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. *Mol Biol Cell* 2006;17:3978-3988.
- Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM: Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension* 2002;40:477-484.
- Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-408.
- MacLeod J: The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol Cell Physiol* 1943;138:512-518.
- Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM: Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* 1993;44:41-50.
- Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J: Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res* 1994;75:233-244.
- Martin GR: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:7634-7638.
- Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC, Knaus UG: Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal* 2006;18:69-82.
- Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Nishikawa S, Williams D, Zsebo K, Hogan BL: Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 1991;353:750-752.
- Matsukura S, Jones PA, Takai D: Establishment of conditional vectors for hairpin siRNA knockdowns. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e77.
- Mayer B, John M, Heinzl B, Werner ER, Wachter H, Schultz G, Böhme E: Brain nitric oxide synthase is a bipterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Letters* 1991;288:187-191.
- Meischl C, Krijnen PA, Sipkens JA, Cillessen SA, Munoz IG, Okroj M, Ramska M, Muller A, Visser CA, Musters RJ, Simonides WS, Hack CE, Roos D, Niessen HW: Ischemia induces nuclear NOX2 expression in cardiomyocytes and subsequently activates apoptosis. *Apoptosis* 2006;11:913-921.
- Meyer JW, Holland JA, Ziegler LM, Chang MM, Beebe G, Schmitt ME: Identification of a functional leukocyte-type NADPH oxidase in human endothelial cells: a potential atherogenic source of reactive oxygen species. *Endothelium* 1999;7:11-22.

- Moe KT, Aulia S, Jiang F, Chua YL, Koh TH, Wong MC, Dusting GJ: Differential upregulation of Nox homologues of NADPH oxidase by tumor necrosis factor- α in human aortic smooth muscle and embryonic kidney cells. *J Cell Mol Med* 2006;10:231-239.
- Morawietz H, Bornstein SR: Leptin, endothelin, NADPH oxidase, and heart failure. *Hypertension* 2006;47:e20; author reply e20-21.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51 Pt 1:263-273.
- Nakamura Y, Makino R, Tanaka T, Ishimura Y, Ohtaki S: Mechanism of H₂O₂ production in porcine thyroid cells: evidence for intermediary formation of superoxide anion by NADPH-dependent H₂O₂-generating machinery. *Biochemistry* 1991;30:4880-4886.
- O'Donnell BV, Tew DG, Jones OT, England PJ: Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J* 1993;290 (Pt 1):41-49.
- O'Donnell VB, Smith GC, Jones OT: Involvement of phenyl radicals in iodonium inhibition of flavoenzymes. *Mol Pharmacol* 1994;46:778-785.
- Ohr T, Merkle D, Birkenfeld K, Echeverri CJ, Schwillle P: In situ fluorescence analysis demonstrates active siRNA exclusion from the nucleus by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* 2006;34:1369-1380.
- Opitz N, Drummond GR, Selemidis S, Meurer S, Schmidt HH: The 'A's and 'O's of NADPH oxidase regulation: a commentary on "Subcellular localization and function of alternatively spliced Nox1 isoforms". *Free Radic Biol Med* 2007;42:175-179.
- Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS: Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 2002;16:948-958.
- Paffenholz R, Bergstrom RA, Pasutto F, Wabnitz P, Munroe RJ, Jagla W, Heinzmann U, Marquardt A, Bareiss A, Laufs J, Russ A, Stumm G, Schimenti JC, Bergstrom DE: Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev* 2004;18:486-491.
- Parimala R, Sachdanandam P: Effect of Plumbagin on some glucose metabolising enzymes studied in rats in experimental hepatoma. *Mol Cell Biochem* 1993;125:59-63.
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D: Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8392-8396.
- Peshavariya HM, Dusting GJ, Selemidis S: Analysis of dihydroethidium fluorescence for the detection of intracellular and extracellular superoxide produced by NADPH oxidase. *Free Radic Res* 2007;41:699-712.
- Petry A, Djordjevic T, Weitnauer M, Kietzmann T, Hess J, Grolach A: NOX2 and NOX4 mediate proliferative response in endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1473-1484.
- Qin L, Liu Y, Qian X, Hong JS, Block ML: Microglial NADPH oxidase mediates leucine enkephalin dopaminergic neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1053:107-120.

- Raoul C, Barker SD, Aebischer P: Viral-based modelling and correction of neurodegenerative diseases by RNA interference. *Gene Ther* 2006;13:487-495.
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ: Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 1992;359:550-551.
- Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ: Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O₂(-) and systolic blood pressure in mice. *Circ Res* 2001;89:408-414.
- Rohwedel J, Maltsev V, Bober E, Arnold HH, Hescheler J, Wobus AM: Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev Biol* 1994;164:87-101.
- Rossi F, Zatti M: Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia* 1964;20:21-23.
- Sabri A, Hughie HH, Lucchesi PA: Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Antioxid Redox Signal* 2003;5:731-740.
- Sauer H, Bekhite MM, Hescheler J, Wartenberg M: Redox control of angiogenic factors and CD31-positive vessel-like structures in mouse embryonic stem cells after direct current electrical field stimulation. *Exp Cell Res* 2005;304:380-390.
- Sauer H, Gunther J, Hescheler J, Wartenberg M: Thalidomide Inhibits Angiogenesis in Embryoid Bodies by the Generation of Hydroxyl Radicals. *Am J Pathol* 2000;156:151-158.
- Sauer H, Hofmann C, Wartenberg M, Wobus AM, Hescheler J: Spontaneous calcium oscillations in embryonic stem cell-derived primitive endodermal cells. *Exp Cell Res* 1998;238:13-22.
- Sauer H, Rahimi G, Hescheler J, Wartenberg M: Effects of electrical fields on cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *J Cell Biochem* 1999;75:710-723.
- Sbarra AJ, Karnovsky ML: The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1959;234:1355-1362.
- Segal AW, Jones OT: Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* 1978;276:515-517.
- Sharma I, Gusain D, Dixit VP: Hypolipidaemic and antiatherosclerotic effects of plumbagin in rabbits. *Indian J Physiol Pharmacol* 1991;35:10-14.
- Shi J, Ross CR, Leto TL, Blecha F: PR-39, a proline-rich antibacterial peptide that inhibits phagocyte NADPH oxidase activity by binding to Src homology 3 domains of p47 phox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:6014-6018.
- Simons JM, Hart BA, Ip Vai Ching TR, Van Dijk H, Labadie RP: Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radic Biol Med* 1990;8:251-258.
- Stevens LC: The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. *Dev Biol* 1970;21:364-382.

- Stolk J, Hiltermann TJ, Dijkman JH, Verhoeven AJ: Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;11:95-102.
- Strubing C, Ahnert-Hilger G, Shan J, Wiedenmann B, Hescheler J, Wobus AM: Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech Dev* 1995;53:275-287.
- Stuehr DJ, Fasehun OA, Kwon NS, Gross SS, Gonzalez JA, Levi R, Nathan CF: Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. *FASEB J* 1991;5:98-103.
- Sturrock A, Cahill B, Norman K, Huecksteadt TP, Hill K, Sanders K, Karwande SV, Stringham JC, Bull DA, Gleich M, Kennedy TP, Hoidal JR: Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L661-L673.
- Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD: Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999;401:79-82.
- Suliman HB, Ali M, Piantadosi CA: Superoxide dismutase-3 promotes full expression of the EPO response to hypoxia. *Blood* 2004;104:43-50.
- Sumimoto H: Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J* 2008;275:3249-3277.
- Tanaka K, Fujimoto Y, Suzuki M, Suzuki Y, Ohtake T, Saito H, Kohgo Y: PI3-kinase p85alpha is a target molecule of proline-rich antimicrobial peptide to suppress proliferation of ras-transformed cells. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:959-967.
- Taniyama Y, Griendling KK: Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. *Hypertension* 2003;42:1075-1081.
- Tojo T, Ushio-Fukai M, Yamaoka-Tojo M, Ikeda S, Patrushev N, Alexander RW: Role of gp91phox (Nox2)-containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Circulation* 2005;111:2347-2355.
- Touyz RM, Yao G, Viel E, Amiri F, Schiffrin EL: Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 2004;22:1141-1149.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350-4354.
- Ueno N, Takeya R, Miyano K, Kikuchi H, Sumimoto H: The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators. *J Biol Chem* 2005;280:23328-23339.
- Ueyama T, Geiszt M, Leto TL: Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Mol Cell Biol* 2006;26:2160-2174.

- Ushio-Fukai M, Alexander RW: Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem* 2004;264:85-97.
- Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov SI, Ma Y, Fujimoto M, Quinn MT, Pagano PJ, Johnson C, Alexander RW: Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res* 2002;91:1160-1167.
- Vignais PV: The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1428-1459.
- Vittet D, Prandini MH, Berthier R, Schweitzer A, Martin-Sisteron H, Uzan G, Dejana E: Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood* 1996;88:3424-3431.
- Warburg O: Beobachtungen über die Oxydationsprozesse im Seeigeelei. *Z Physiol Chem* 1908;57:1-16.
- Wartenberg M, Donmez F, Ling FC, Acker H, Hescheler J, Sauer H: Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells. *Faseb J* 2001;15:995-1005.
- Wartenberg M, Gunther J, Hescheler J, Sauer H: The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents. *Lab Invest* 1998;78:1301-1314.
- Wartenberg M, Hoffmann E, Schwindt H, Grunheck F, Petros J, Arnold JR, Hescheler J, Sauer H: Reactive oxygen species-linked regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in Nox-1 overexpressing prostate tumor spheroids. *FEBS Lett* 2005;579:4541-4549.
- Wartenberg M, Wolf S, Budde P, Grunheck F, Acker H, Hescheler J, Wartenberg G, Sauer H: The antimalaria agent artemisinin exerts antiangiogenic effects in mouse embryonic stem cell-derived embryoid bodies. *Lab Invest* 2003;83:1647-1655.
- Wenzel S, Taimor G, Piper HM, Schluter KD: Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes. *Faseb J* 2001;15:2291-2293.
- Wiles MV, Keller G: Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* 1991;111:259-267.
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM: Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988;336:684-687.
- Wingler K, Wunsch S, Kreutz R, Rothermund L, Paul M, Schmidt HH: Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1456-1464.
- Wobus AM: Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspects Med* 2001;22:149-164.
- Wobus AM, Boheler KR: Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 2005;85:635-678.

Wobus AM, Rohwedel J, Maltsev V, Hescheler J: Development of cardiomyocytes expressing cardiac-specific genes, action potentials, and ionic channels during embryonic stem cell-derived cardiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1995;752:460-469.

Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J: Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation* 1991;48:173-182.

Wong JL, Wessel GM: Reactive oxygen species and Udx1 during early sea urchin development. *Dev Biol* 2005;288:317-333.

Wu X, Hardy VE, Joseph JI, Jabbour S, Mahadev K, Zhu L, Goldstein BJ: Protein-tyrosine phosphatase activity in human adipocytes is strongly correlated with insulin-stimulated glucose uptake and is a target of insulin-induced oxidative inhibition. *Metabolism* 2003;52:705-712.

Xiao L, Pimentel DR, Wang J, Singh K, Colucci WS, Sawyer DB: Role of reactive oxygen species and NAD(P)H oxidase in alpha(1)-adrenoceptor signaling in adult rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C926-934.

Yamaoka-Tojo M, Ushio-Fukai M, Hilenski L, Dikalov SI, Chen YE, Tojo T, Fukai T, Fujimoto M, Patrushev NA, Wang N, Kontos CD, Bloom GS, Alexander RW: IQGAP1, a novel vascular endothelial growth factor receptor binding protein, is involved in reactive oxygen species--dependent endothelial migration and proliferation. *Circ Res* 2004;95:276-283.

Yan SR, Berton G: Regulation of Src family tyrosine kinase activities in adherent human neutrophils. Evidence that reactive oxygen intermediates produced by adherent neutrophils increase the activity of the p58c-fgr and p53/56lyn tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1996;271:23464-23471.

Yang M, Foster E, Kahn AM: Insulin-stimulated NAD(P)H oxidase activity increases migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens* 2005;18:1329-1334.

Yu J, Thomson JA: Pluripotent stem cell lines. *Genes Dev* 2008;22:1987-1997.

Anhang

Zusammensetzung von Lösungen und Puffern

4T1-Medium

DMEM	86,6 %
FBS	8,7 %
β-Mercaptoethanol (0,07%)	1 %
NEA (100x)	1 %
L-Glutamin (200mM)	1 %
Sodiumpyruvate (100 mM)	1 %
Pen/Strep (10000U/1000 µg/ml)	0,5 %

CGR8-Medium

GMEM	90 %
FBS (Sigma)	9 %
β-Mercaptoethanol (0,7%)	0,05 %
L-Glutamin (200 mM)	0,9 %
LIF (10 ⁵ Units/ml)	0,9 %

CGR8-Differenzierungsmedium

Basal Iscove	81,16 %
FBS (Sigma)	16,31 %
β-Mercaptoethanol (0,7%)	0,08 %
L-Glutamin (200mM)	1 %
NEA (100x)	1 %

HEK293T-Medium

DMEM	89 %
FBS	10 %
Pen/Strep	1 %

Einfriermedium für CGR8-Zellen

CGR8-Komplettmedium	90 %
DMSO	10 %

Einfriermedium für 4T1-Zellen

4T1-Komplettmedium	72 %
FBS	20 %
DMSO	8 %

E1-Ca²⁺-Puffer

NaCl	135 mM
KCl	5,4 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,8 mM
MgCl ₂ x 6H ₂ O	1,0 mM
Glucose x H ₂ O	10 mM
HEPES	10 mM
Lagerung: 4 °C	pH 7,4, steril filtrieren

10 x Phosphat-gepufferte Saline (10 x PBS)

NaCl	137 mM
KCl	27 mM
Na ₂ HPO ₄	81 mM
KH ₂ PO ₄	15 mM
Lagerung: 4 °C	pH 7,4; autoklavieren

PBS-T (1%)

TritonX-100	1 % (v/v)
Lagerung: 4 °C	in 1xPBS

10x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE)

TRIS	0,89 M
Borsäure	0,99 M
EDTA	100 mM
Lagerung: 20 °C	in Aqua Bidest.

SDS-PAGE Ladepuffer

Sammelgel-Puffer (0,5 M TRIS-HCl; pH 6,8)	2,5 ml
SDS (10%)	2 ml
Glycerol (99%)	1 ml
Harnstoff	3,6 g
Bromphenolblau	10 mg
DTT	500 mg
Lagerung: aliquotiert, -20 °C	Add 10 ml AquaBidest.

Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE

TRIS-Base	25 mM
Glycin	190 mM
SDS	1 % (w/v)

Transferpuffer

TRIS-Base	25 mM
Glycin	190 mM
Methanol	20 %

Homogenisationspuffer

TRIS-HCl ; pH 7,5	20 mM
TritonX-100	1 %
EDTA	1 mM

Komplettierung des Homogenisationspuffers

DTT	1 mM
PMSF	1 mM
Aprotinin	10 µg/ml
Pepstatin A	5 µg/ml
Leupeptin	25 µg/ml
SOV	1 mM
PIC	1 %
frisch ansetzen	

10 x NetG-Puffer

NaCl	1,5 M
EDTA	0,05 M
TRIS	0,1 M
Tween20	0,5 %
Gelantine	0,5 %

10 x TRIS-buffered Saline (TBS)

TRIS-HCl	500 mM
NaCl	1,5 M
ph 7,4	

Ponceau S-Lösung

Ponceau S	0,1 % (w/v)
Essigsäure	5 % (v/v)

LB-Agarplatten

LB-Medium	400 ml
LB-Agar	6,5 g
Ampicillin	400 µl

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
Ampicillin	100 µg/ml

Strippingpuffer (Redetektionspuffer)

Mercaptoethanol	100 mM
SDS	2 % (w/v)
Tris-HCl, ph 8,0	6,25 mM

Publikationen und Posterbeiträge

1. Publikationen

Sauer H, Ruhe C, Müller JP, Schmelter M, D'Souza R, Wartenberg M: Reactive oxygen species and upregulation of NADPH oxidases in mechanotransduction of embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* 2008; 477:397-418.

Buggisch M, Ateghang B, Ruhe C, Strobel C, Lange S, Wartenberg M, Sauer H: Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase. *J Cell Sci* 2007; 120:885-894.

Günther S, Ruhe C, Derikito MG, Böse G, Sauer H, Wartenberg M: Polyphenols prevent cell shedding from mouse mammary cancer spheroids and inhibit cancer cell invasion in confrontation cultures derived from embryonic stem cells. *Cancer Letters* 2007; 250:25-35.

Knoll N, Ruhe C, Veeriah S, Sauer J, Glei M, Gallagher EP, Pool-Zobel BL: Genotoxicity of 4-hydroxy-2-nonenal in human colon tumor cells is associated with cellular levels of glutathione and the modulation of glutathione S-transferase A4 expression by butyrate. *Toxicol Sci* 2005; 86:27-35.

2. Posterbeiträge

Ruhe C, Müller J, Bartsch C, Figulla H, Sauer H, Wartenberg M: NOX1, NOX2 and NOX4 are key regulators of mouse embryonic stem cell-derived cardiovascular differentiation.

75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim April 2009

Ruhe C, Müller J, Bartsch C, Figulla H, Sauer H, Wartenberg M: NOX1, NOX2 and NOX4 are key regulators of mouse embryonic stem cell-derived cardiovascular differentiation.

88. Jahreskongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Gießen März 2009

Ruhe C, Günther S, Derikito MG, Sauer H, Wartenberg M: Polyphenols and NOX inhibitors suppressed invasion of cancer cells in confrontation cultures with embryonic stem cells.

86. Jahreskongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Hannover März 2007

Günther S, Derikito MG, Boese G, Ruhe C, Sauer H, Wartenberg M: Polyphenols as inhibitors of tumor cell growth, migration and adherence.

85. Jahreskongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, München März 2006

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich, Carola Ruhe, erkläre hiermit, dass

- mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe,
- mich keine anderen als die angegebenen Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben,
- ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit den Inhalten der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich diese Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 26.08.2009

Carola Ruhe

Lebenslauf

Zu meiner Person Carola Ruhe, ledig
geboren am 26. November 1976 in Bad Langensalza

Studium

Seit 06/2009	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Forschungszentrum Lobeda (FZL) in der Arbeitsgruppe Nephrologie bei Herrn Prof. Dr. Wolf
04/2007-05/2009	Fortsetzung der Promotion am Forschungszentrum Lobeda (FZL) in der Arbeitsgruppe Molekulare Kardiologie und Stammzellforschung bei Frau Prof. Dr. Wartenberg
03/2005-03/2007	Beginn der Promotion bei Frau Prof. Dr. Wartenberg am Institut für Polymerforschung der GKSS mbH in Teltow
12/2003-10/2004	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie in Jena zum Thema: „Untersuchung zur Modulierbarkeit der Gen und Proteinexpression von Glutathion-S-Transferase A4-4 in HT29-Zellen“ bei Frau Prof. Dr. Pool-Zobel.
03-04/2002	Forschungspraktikum am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie in Jena zum Thema: „Modulation der GSTM1 und M2 in HT29-Zellen nach Inkubation mit Butyrat“ bei Frau Prof. Dr. Pool-Zobel
03/2000	Forschungspraktikum am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben zum Thema: „Überexpression von LEC1 und ABI3 in <i>E.coli</i> BL21 mit anschließender Isolation und Reinigung sowie Untersuchung auf DNA-Protein- und Protein-Protein-Wechselwirkungen“ bei Frau Dr. Mönke
1998-2004	Studium der Biochemie/Molekularbiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena Abschluss: Diplom Biochemiker/Molekularbiologe

Schulische und berufliche Ausbildung

1996-1998	Ausbildung zur staatlich-geprüften Chem.-techn. Assistentin (Schwerpunkt: Umweltanalytik), Waltershausen
1993-1995	Friedrich-Jahn-Gymnasium, Großengottern Abschluss: Abitur
1990-1993	Realschule Clemens Brentano, Bad Langensalza
1983-1990	Polytechnische Oberschule, Bad Langensalza

Sonstige Tätigkeiten

03/2004-03/2005	Studentische Hilfskraft, Max-Planck-Institut (MPI) für chemische Ökologie, Jena; Abteilung: Molekulare Ökologie; Prof. Dr. Ian T. Baldwin
11/2003 & 03/2004	Betreuung des Praktikums Molekulare Toxikologie für Ernährungswissenschaftler, Leitung: Frau Prof. Dr. Pool-Zobel
05/2002 & 05/2003	Betreuung des Molekularbiologischen Praktikums für Ernährungswissenschaftler, Leitung: Herr Dr. Stefan Wölfl
1995-1996	Freiwilliges Ökologisches Jahr

Jena, 26.08.2009	Carola Ruhe
------------------	-------------